



Escola Tècnica Superior d'Enginyeria  
de Telecomunicació de Barcelona

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

CLÍNIC  
BARCELONA  
Hospital Universitari



# **Herramientas de procesamiento de imagen para la microscopía cuantitativa para evaluar el remodelado cardíaco a nivel celular**

Patricia García Cañadilla

Director del proyecto: Iván Amat-Roldán

Director poniente: Ferran Marqués Acosta

E. T. S. d'Enginyeria de Telecomunicació de Barcelona (ETSETB)

Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)

Barcelona, Julio de 2010



*The most incomprehensible thing about the world  
is that it is at all comprehensible*

Albert Einstein





# Agradecimientos

A mi director de proyecto, Ivan Amat, por su paciencia, por su dedicación y por todo lo que me ha enseñado. También quiero agradecer a Ferran Marquès, mi director poniente, por compartir sus conocimientos y por todo el entusiasmo y a Eduard Gratacós, responsable del Grupo de investigación Maternofetal, por aportar todo el rigor clínico necesario a este proyecto.

A la Iratxe Torre y Anna Gonzalez, por aportarme todo el conocimiento biológico necesario para la realización de este proyecto. Y también a Igor por compartir sus conocimientos en cardiología fetal.

Al grupo de investigación en medicina fetal del Hospital Clínic, a Maite y David por todos los buenos momentos vividos. A todos los ingenieros con los que he compartido todo este año, por ayudarme, por los muchos cafés y por todos los buenos momentos que hemos compartido y que espero seguir compartiendo.

A mis padres Gregorio y Pilar, por haberme apoyado durante toda mi vida, y porque sin ellos hoy no estaría aquí. A mi hermano, porque sin él mi vida hubiese sido muy aburrida.

A todos mis amigos de la carrera, de Distorsió y de AEES, en especial a Marta con la que he compartido los mejores años de esta carrera y se ha convertido en un trozo de mi, a Sergi, Miqui, Hilario, Jaume, Pau, Kurko, Nico, Arnau, Kescuín, Pedro, Román, Guille, Dani, Eki, Segú, Will, Moe, Sonia y a todos los que me dejo, que soys muchos.

A Jonathan, por aguantarme, que no es tarea fácil, y por ayudarme siempre, sin esperar nada a cambio, y recibirme cada día, por muy malo que sea, con una sonrisa; por ser como eres.

Patricia García, Julio de 2010



# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Motivación . . . . .	1
1.2. Técnicas de imagen . . . . .	2
1.3. Estructura del proyecto . . . . .	5
<b>2. El corazón y sus unidades elementales, los cardiomiocitos</b>	<b>7</b>
2.1. El corazón: función y anatomía . . . . .	7
2.1.1. Anatomía . . . . .	7
2.1.2. Función cardíaca . . . . .	8
2.2. Las unidades elementales del miocardio: los cardiomiocitos . . .	9
2.2.1. Estructura . . . . .	9
2.2.2. Composición . . . . .	9
2.2.3. Electrofisiología . . . . .	11
2.3. Las unidades elementales de la maquinaria contráctil: el sar- cómero . . . . .	11
2.3.1. Ultraestructura . . . . .	11
2.3.2. Composición . . . . .	12
2.3.3. Función . . . . .	12

<b>3. Microscopía</b>	<b>15</b>
3.1. Historia de la microscopía . . . . .	15
3.2. Técnicas modernas . . . . .	16
3.2.1. Microscopía confocal . . . . .	16
3.2.2. Microscopía de fluorescencia de dos fotones . . . . .	18
3.2.3. Microscopía segundo armónico . . . . .	20
3.3. Aplicaciones para observar el miocardio . . . . .	22
3.3.1. Fluorescencia (single-photon y two-photon) . . . . .	22
3.3.2. SHIM (Second Harmonic Imaging) . . . . .	25
<b>4. La restricción de crecimiento induce un remodelado cardiovascular</b>	<b>29</b>
4.1. Prevalencia de la enfermedad . . . . .	29
4.2. Remodelado cardiovascular . . . . .	30
4.3. Modelo animal de restricción de crecimiento . . . . .	31
4.4. Correlación entre la patología del humano y el modelo animal .	32
<b>5. Descripción de la herramienta</b>	<b>33</b>
5.1. Introducción . . . . .	33
5.2. Herramienta 1: medida de distancias en estructuras fibrilares .	33
5.2.1. Limitaciones previstas para la medida de distancias . . .	35
5.3. Herramienta 2: seguimiento de fibras . . . . .	36
5.4. Herramienta 3: modelo paramétrico del sarcómero . . . . .	36

<b>6. Herramienta 1: Medida de distancias en estructuras fibrilares</b>	<b>39</b>
6.1. Introducción . . . . .	39
6.2. Cálculo de las distancias mediante transformada de Fourier . .	40
6.2.1. Prueba de concepto . . . . .	40
6.2.2. La transformada de Fourier discreta . . . . .	41
6.2.3. Algoritmo para el cálculo de las distancias . . . . .	43
6.2.4. Limitaciones . . . . .	50
6.3. Cálculo de las distancias mediante la autocorrelación . . . . .	51
6.3.1. Prueba de concepto . . . . .	51
6.3.2. La autocorrelación . . . . .	51
6.3.3. Algoritmo para el cálculo de las distancias . . . . .	53
6.4. Comparación de los dos enfoques: Fourier y autocorrelación . .	55
6.5. Validación del cálculo de las distancias . . . . .	56
6.5.1. Distancia de localizaciones de SERCA . . . . .	56
6.5.2. Distancias del sarcómero . . . . .	58
6.5.3. Conclusiones . . . . .	60
6.6. GUI para el cálculo de las distancias . . . . .	61
6.7. Conclusiones . . . . .	61
<b>7. Herramienta 2: Seguimiento de fibras</b>	<b>63</b>
7.1. Motivación . . . . .	63
7.2. Cálculo de la orientación local de las fibras . . . . .	64
7.2.1. Algoritmo para el cálculo de la orientación local de las fibras . . . . .	66

7.3. Seguimiento de las fibras . . . . .	67
7.3.1. Propagación de las líneas . . . . .	68
7.3.2. Interpolación de los puntos . . . . .	69
7.3.3. Elección de las semillas . . . . .	70
7.3.4. Algoritmo para la reconstrucción de fibras . . . . .	71
7.4. Resultados de la reconstrucción de las fibras . . . . .	71
7.5. Limitaciones . . . . .	72
7.6. Conclusiones . . . . .	73
<b>8. Herramienta 3: Modelo paramétrico</b>	<b>75</b>
8.1. Motivación . . . . .	75
8.1.1. Definición de un sarcómero . . . . .	75
8.2. Modelo genérico: sarcómeros con amplitudes y anchuras diferentes . . . . .	77
8.2.1. Autocorrelación de un sarcómero. . . . .	77
8.2.2. Autocorrelación de una miofibrilla compuesta por M sarcómeros . . . . .	80
8.3. Modelo condicionado: sarcómeros con amplitudes diferentes pero mismas anchuras . . . . .	82
8.3.1. Autocorrelación de un sarcómero . . . . .	83
8.3.2. Autocorrelación de una miofibrilla compuesta por M sarcómeros . . . . .	84
8.4. Modelo simétrico: sarcómeros con amplitudes y anchuras iguales	85
8.4.1. Autocorrelación de un sarcómero . . . . .	86
8.4.2. Autocorrelación de una miofibrilla compuesta por M sarcómeros . . . . .	87

8.5. Evaluación de los diferentes modelos . . . . .	88
8.6. Validación del modelo matemático . . . . .	90
8.7. Limitaciones . . . . .	92
8.8. Conclusiones . . . . .	92
<b>9. Resultados de la herramienta integral</b>	<b>93</b>
9.1. Introducción . . . . .	93
9.2. Validación . . . . .	94
9.2.1. Distancia entre localizaciones de SERCA . . . . .	94
9.2.2. Distancias del sarcómero . . . . .	95
9.3. Conclusiones . . . . .	96
<b>10.Resultados de relevancia clínica en animales y humanos</b>	<b>97</b>
10.1.Resultados en el modelo animal . . . . .	97
10.1.1.Distancia de localizaciones de SERCA . . . . .	97
10.1.2.Distancias del sarcómero . . . . .	98
10.2.Resultados de muestras humanas . . . . .	99
10.2.1.Distancias del sarcómero . . . . .	100
<b>11.Conclusiones y futuro</b>	<b>103</b>
11.1.Conclusiones . . . . .	103
11.2.Trabajo futuro . . . . .	104
<b>Bibliografía</b>	<b>107</b>





# Índice de figuras

1.1. Técnicas de imagen médica y molecular . . . . .	3
2.1. Capas del tejido cardíaco [23] . . . . .	8
2.2. Anatomía cardíaca [28] . . . . .	8
2.3. Diferencias entre los diferentes tejidos musculares [20] . . . . .	9
2.4. Estructura de las miofibras y sarcómeros [5] . . . . .	10
2.5. Detalle de una miofibra de un cardiomiocito [13] . . . . .	10
2.6. Estructura del sarcómero (imagen obtenida mediante microscopía de electrones) . . . . .	12
3.1. Primer microscopio óptico [21] . . . . .	15
3.2. Esquema de un microscopio confocal . . . . .	17
3.3. Diagrama de energía[6] . . . . .	18
3.4. Diagrama de excitación de un fotón (izquierda) y de dos fotones (derecha) [27] . . . . .	19
3.5. Comparación de SHG con 2PE fluorescence [24] . . . . .	21
3.6. Sección de ventrículo izquierdo pasando a través de un vaso sanguíneo . . . . .	23
3.7. Distribución de SERCA en el retículo sarcoplasmático . . . . .	24
3.8. Diferencias de calidad de imagen entre microscopio confocal y de multifotones [18] . . . . .	25

3.9. Área de excitación en un microscopio confocal y en un microscopio de multifotones [29] . . . . .	25
3.10. Imagen de un cardiomiocito en detalle obtenido mediante SHG	26
3.11. Diagrama señal excitación y señal obtenida de SHG y 2PEF . .	27
3.12. Imagen de tejido del miocardio. En rojo y azul señal de 2PEF (obtenida cada una mediante diferentes tintes) y en verde señal de SHG. . . . .	28
4.1. Diferencias en la forma del corazón fetal [10] . . . . .	30
4.2. Remodelado cardíaco según daño [2] . . . . .	30
4.3. Modelo animal de restricción de crecimiento . . . . .	31
5.1. Longitud del sarcómero . . . . .	34
5.2. Localización de SERCA [26] . . . . .	34
5.3. Señal de localizaciones de SERCA en la dirección de una fibra .	35
5.4. Señal de SHG de sarcómeros . . . . .	35
5.5. Imagen de sarcómeros con diferente contexto local . . . . .	36
5.6. Herramienta integrada . . . . .	37
6.1. FFT de las imágenes de SERCA (izquierda) y cardiomiocitos (derecha) . . . . .	40
6.2. Ejemplo detección frecuencias de interés en fibras de sarcómeros (arriba), y SERCA (abajo) . . . . .	41
6.3. Ejemplos de transformadas de Fourier de señales 2D [19] . . . .	43
6.4. Algoritmo para el cálculo de las distancias mediante FFT . . . .	44
6.5. Imagen original (izquierda) y imagen filtrada (derecha) . . . . .	45
6.6. Determinación del umbral para la binarización . . . . .	46

6.7. Binarización de la imagen FFT . . . . .	46
6.8. Transformada de Hough y ejemplos [19] . . . . .	46
6.9. Transformada Hough de la FFT . . . . .	47
6.10. Obtención de la recta en la dirección de interés . . . . .	47
6.11. Obtención del perfil frecuencial de la imagen . . . . .	48
6.12. Perfil frecuencial . . . . .	48
6.13. Perfil frecuencial promediado . . . . .	49
6.14. Perfil frecuencial (azul) y primera derivada (verde) . . . . .	50
6.15. Autocorrelación de las imágenes de SERCA (izquierda) y sarcómeros (derecha) . . . . .	51
6.16. Ejemplo detección distancias en sarcómeros (arriba) y SERCA (abajo) . . . . .	52
6.17. Algoritmo para el cálculo de las distancias mediante la autocorrelación . . . . .	53
6.18. Cálculo de la dirección mediante regionprops de MATLAB . . .	55
6.19. Requerimientos de SNR y contraste . . . . .	56
6.20. Representación <i>boxplot</i> . . . . .	57
6.21. Boxplot de las medidas . . . . .	58
6.22. Boxplot del ratio entre distancias . . . . .	60
6.23. GUI para el cálculo de las distancias . . . . .	61
7.1. Diferentes orientaciones de las fibras en una imagen de SERCA (izquierda) y sarcómeros (derecha) . . . . .	64
7.2. Vectores propios según las direcciones de máxima dispersión de los datos [25] . . . . .	65
7.3. Selección de los bloques para el cálculo de la orientación local .	67

7.4. Imagen de orientación local de SERCA (izquierda) y sarcómeros (derecha) . . . . .	67
7.5. Eliminación de los valores de orientación erróneos . . . . .	68
7.6. Mapa de direcciones locales en imagen de SERCA . . . . .	68
7.7. Mapa de direcciones locales en imagen de sarcómeros . . . . .	69
7.8. Ejemplo de propagación de líneas a partir de las direcciones de máxima difusión, representadas por elipses . . . . .	70
7.9. Obtención de los puntos de la trayectoria . . . . .	70
7.10. Resultado de la reconstrucción de las fibras de sarcómeros . . .	72
7.11. Resultado de la reconstrucción de las fibras de SERCA . . . . .	73
8.1. Efecto de la interferencia en la distancia intrasarcomérica . . .	76
8.2. Señal de SHG a lo largo de un sarcómero según <i>Thierry Boulesteix</i> [7] . . . . .	77
8.3. Definición de la señal de un sarcómero como suma de gaussianas	78
8.4. Autocorrelación de un sarcómero definido lo más general posible	80
8.5. Miofibra formada por 5 sarcómeros . . . . .	81
8.6. Autocorrelación de un sarcómero formado por gaussianas que tienen igual $\sigma$ . . . . .	83
8.7. Autocorrelación de un sarcómero simétrico (igual $\alpha$ y igual $\sigma$ para ambas gaussianas) . . . . .	86
8.8. Evolución del error y tiempo de ejecución según el modelo utilizado . . . . .	89
8.9. Diferencia de señal de SHG de un sarcómero . . . . .	90
8.10. Ajuste mediante modelo con igual anchura ( $\sigma$ ) y distintas amplitudes ( $\alpha_i$ ) . . . . .	91

9.1. Diagrama de la herramienta integrada . . . . .	94
10.1. Distancia de localizaciones de SERCA en controles y casos . . .	98
10.2. Comparación de la distancia intrasarcomérica entre controles y casos en modelo animal . . . . .	99
10.3. Comparación de la distancia intersarcomérica entre controles y casos en modelo animal . . . . .	100
10.4. Comparación de la distancia intrasarcomérica entre controles y casos en muestras humanas . . . . .	101
10.5. Comparación de la distancia intersarcomérica entre controles y casos en muestras humanas . . . . .	102



# Índice de Tablas

6.1. Media y varianza de las medidas de la distancian en el caso monoperiódico . . . . .	57
6.2. Parámetros de calidad de las medidas . . . . .	59
6.3. Medias y varianzas de las medidas de las distancias en el caso biperiódico . . . . .	59
6.4. Parámetros de calidad de las medidas de la distancias en el caso biperiódico . . . . .	59
8.1. Medidas de tiempo de ejecución y error cometido al ajustar los datos según el modelo escogido . . . . .	89
8.2. Valores de las amplitudes y anchuras obtenidos en el ajuste del modelo paramétrico . . . . .	91
8.3. Valores de las distancias obtenidas con el modelo paramétrico y comparadas con las calculadas manualmente y las obtenidas mediante la herramienta del cálculo de distancias, en 10 imá- genes distintas. . . . .	92
9.1. Comparación entre medidas manuales, mediante delineación manual y mediante la herramienta integral en imágenes de SERCA . . . . .	95
9.2. Comparación entre medidas manuales y medidas mediante her- ramienta 1, con herramienta 1 y 2 y con la herramienta integral (herramientas 1, 2 y 3) . . . . .	95





# Capítulo 1

## Introducción

**E**STE proyecto se enmarca dentro de una línea transdisciplinar en el grupo de investigación de medicina fetal y perinatal (IDIBAPS) del Hospital Clínic de Barcelona.

Las imágenes necesarias para realizar este proyecto han sido adquiridas en la unidad de microscopía del servicio científico-técnico de la UB, en el Hospital Clínic.

### 1.1. Motivación

Actualmente, la enfermedad cardiovascular sigue siendo la causa principal de mortalidad y morbilidad en el mundo occidental. A pesar de las mejoras de la sanidad los resultados evidencian que no se ha podido reducir el número de afectados. En el informe anual de la European Cardiovascular Disease Statistics, se expone que únicamente en Europa mueren más de 2.000.000 de personas anualmente por deficiencias cardíacas.

En general, la disfunción cardíaca en los fetos que presentan restricción de crecimiento durante la gestación (CIR) se asocia a un aumento de la mortalidad por motivos cardiovasculares en adultos (7 veces más a partir de los 50 años). La restricción de crecimiento fetal afecta a un 5-10 % de los embarazos y, sólo en Europa, se producen 10.000.000 de nacimientos al año, siendo así una enfermedad con cierta prevalencia si se consideran grados sutiles y severos[1].

El corazón es un órgano central en los mecanismos adaptativos de los fetos que padecen CIR. Este síndrome viene inducido por una insuficiencia placentaria, cosa que restringe los nutrientes y el oxígeno al feto de forma sutil pero crónica. Un gran número de estudios han reportado diferencias significativas en los parámetros ecocardiográficos, principalmente relacionados con la función diastólica y alteraciones en la expresión génica, junto con la aparición de signos bioquímicos de daño celular del miocardio[11]. Recientemente se ha demostrado que CIR induce un remodelado cardiovascular y los corazones de estos niños son menos alargados[10]. Por ello es necesario comprender a un nivel más elemental que provoca este remodelado.

El remodelado cardiovascular es una respuesta fisiológica compensatoria a un evento o condición que compromete la función cardíaca que conlleva alteraciones en la estructura del miocardio. Estos cambios en el tiempo (meses o años) puede deteriorar la función miocárdica hasta el punto de sufrir una insuficiencia cardíaca crónica intratable. Por lo tanto, el remodelado cardíaco generalmente se considera perjudicial fuera del desarrollo normal. El efecto adverso del remodelado en el curso clínico ha generado un gran interés para intentar definir los mecanismos involucrados, y en buscar los tratamientos que pueden prevenir o revertir el proceso de remodelado cardíaco [16].

La finalidad de este proyecto es proponer una herramienta basada en microscopía cuantitativa que permita evaluar si el remodelado cardíaco viene precedido por un remodelado celular. Para la realización de este estudio usamos el modelo patológico de restricción de crecimiento intrauterino que se ha demostrado induce un remodelado cardíaco a nivel orgánico [10].

## **1.2. Técnicas de imagen**

De acuerdo con varias encuestas, los médicos consideran que la imagen ha sido y es, con mucha diferencia, el avance técnico que mayor impacto ha tenido en su práctica clínica. La información diagnóstica que proporcionan los sistemas de imagen es enormemente apreciada por el médico, hasta el punto de que, hoy en día, resulta difícil encontrar situaciones clínicas en las que no se haya hecho uso de una o más técnicas de imagen.

Hoy en día, las técnicas de imagen médica no sólo tienen un propósito clínico, para diagnóstico, sino que también se han constituido en una herramienta imprescindible para la investigación, tanto en humanos como en animales. Mediante las diferentes técnicas de imagen médica somos capaces de visualizar los diferentes órganos del cuerpo humano y centrarnos solo en una región de estos.

En el contexto de la imagen médica, se puede calificar como imagen molecular a toda aquella modalidad de imagen capaz de detectar procesos celulares a nivel molecular en vivo.

El reciente auge que está cobrando la imagen molecular se debe a una serie de circunstancias, entre las que se encuentra el hecho de que la tecnología haya alcanzado un grado de madurez en cuanto al desarrollo de sistemas de imagen. El acercamiento entre la biología molecular y las tecnologías de imagen ha sido en gran parte el desencadenante de este rápido desarrollo. Cabe esperar que en un futuro cercano se produzca la transferencia de estas técnicas a la práctica clínica, abriendo nuevos horizontes al estudio y tratamiento de enfermedades en humanos.

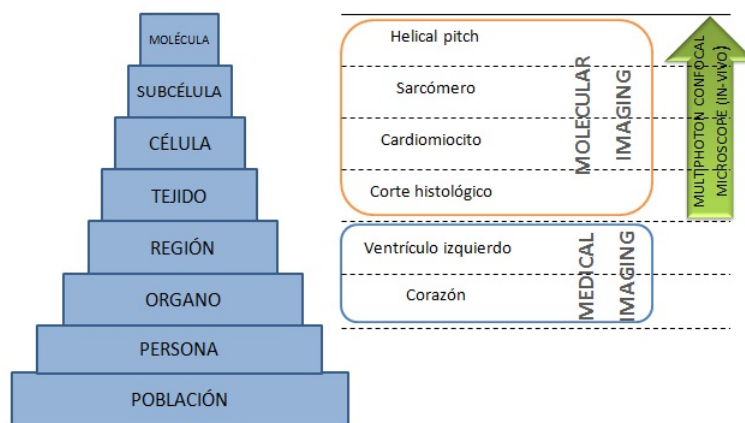


Figura 1.1: Técnicas de imagen médica y molecular

Actualmente hay diversos métodos para obtener imágenes médicas. Los más destacados son los siguientes:

- Ecografía: Emisión de ondas acústicas para formar una imagen a partir de los ecos. La ecografía es un método no invasivo y portable que permite

captar imágenes de los tejidos blandos. En general se considera que con la ecografía se obtienen imágenes con bajo contraste y, por tanto, tiene una capacidad de pronóstico reducida.

- **Resonancia magnética:** Técnica de imagen que utiliza un campo magnético constante y de intensidad elevada originado principalmente por un imán de entre 0,15 y 3 Teslas. El campo magnético constante se encarga de alinear los momentos magnéticos de los núcleos atómicos básicamente en dos direcciones. La intensidad de campo y el momento magnético del núcleo determinan la frecuencia de resonancia de los núcleos. La resonancia magnética genera una radiación ionizante que, dependiendo del tiempo de exposición del paciente, puede generar riesgos en la salud todo y considerarse una técnica no invasiva. El equipo de resonancia magnética no es portable y no se puede utilizar si hay objetos ferromagnéticos en la sala o en el individuo a explorar. En medicina se utiliza principalmente para observar alteraciones en los tejidos, cánceres y otras patologías.
- **Microscopía:** Es la técnica que permite producir imágenes visibles de estructuras o detalles demasiado pequeños para ser percibidos a simple vista. Utiliza la luz como fuente de iluminación. La microscopía es una técnica de imagen de alta resolución pero con poca penetrabilidad, lo que limita su uso.

En este proyecto usaremos técnicas de microscopía para comprender la patofisiología<sup>1</sup> y evaluar si existe un remodelado celular previo al remodelado del corazón.

Se han realizado muchos intentos para estimar la cantidad o concentración de un determinado componente a partir de imágenes obtenidas mediante microscopía, como proporción de la señal detectada (método fotométrico). En este proyecto, nos acercamos a ello en un ámbito diferente y buscamos las características morfológicas relacionadas con un proceso biológico (enfoque morfométrico). De esta manera podemos evitar las limitaciones típicas de las técnicas espectroscópicas o ratiométricas, que han sido ampliamente estudiadas e informadas .

---

<sup>1</sup>La patofisiología estudia los cambios en las funciones de las células y órganos asociados a la enfermedad y el envejecimiento.

Las estructuras cardíacas están caracterizadas por estructuras fibrilares. Para evaluar la existencia de un remodelado cardíaco a nivel celular se desean obtener características morfométricas de estas estructuras y para ello, desarrollaremos una serie de herramientas de procesamiento de imagen para caracterizar morfológicamente las fibras del miocardio. Las herramientas que se van a diseñar son:

- Medida de distancia en estructuras fibrilares: nos permitirá cuantificar globalmente distancias en el tejido cardíaco.
- Seguimiento de fibras: para poder seguir cada una de las fibras que componen la imagen de tejido cardíaco y así poder realizar posteriormente una medida de distancia localmente.
- Modelo paramétrico del sarcómero: nos permitirá conocer cómo está formada cada fibra y así poder detectar errores en las medidas de distancia y corregirlos.
- Herramienta integrada: la integración de las tres herramientas anteriores que proporcionará finalmente, de manera automática, el valor de las distancias promedio de cada imagen, que caractericen morfológicamente secciones de tejido cardíaco.

### **1.3. Estructura del proyecto**

El presente proyecto llamado *Herramientas de procesamiento de imagen para la microscopía cuantitativa para evaluar el remodelado cardíaco a nivel celular* surge de la voluntad de aportar nuevos métodos basados en el procesamiento de imágenes de tejido cardíaco obtenidas mediante microscopía que permitan caracterizar morfológicamente el tejido cardíaco.

Por lo tanto, primeramente se describirá brevemente el corazón (capítulo 2), las técnicas de microscopía (capítulo 3) y la restricción de crecimiento como modelo patológico para estudiar el remodelado cardiovascular (capítulo 4).

Después de describir el modelo patológico y las técnicas utilizadas se describirá la herramienta integral (capítulo 5), la herramienta para la medida de distancias (capítulo 6), la herramienta para el seguimiento de las

fibras (capítulo 7) y la herramienta del modelo paramétrico del sarcómero (capítulo 8). Tras el desarrollo de las diferentes herramientas se procederá a evaluar los resultados técnicos de la herramienta integral (capítulo 9), para pasar posteriormente a evaluar la viabilidad clínica con los resultados de los parámetros obtenidos con la herramienta integral (capítulo 10), tanto en el caso animal, como en el humano.

Finalmente, se presentará las principales conclusiones de este proyecto final de carrera y las líneas de trabajo futuro necesarias para el desarrollo completo de la herramienta (capítulo 11).

## Capítulo 2

# El corazón y sus unidades elementales, los cardiomiocitos

### 2.1. El corazón: función y anatomía

#### 2.1.1. Anatomía

**E**L corazón es el músculo del sistema circulatorio que bombea constantemente sangre por todo el cuerpo. Está rodeado de una membrana que lo protege y impide que se desplace de su posición, que se denomina pericardio. La pared cardíaca se subdivide en tres capas del tejido: epicardio, miocardio y endocardio, la más interna (figura 2.1). El miocardio (o músculo cardíaco) constituye gran parte de la masa muscular cardíaca, siendo el responsable de la función de bombeo del corazón. El endocardio es la capa interna que constituye el revestimiento liso de las cavidades internas.

El corazón se divide en cuatro cavidades: dos superiores, aurículas, y dos inferiores, ventrículos (figura 2.2). Las aurículas reciben la sangre del sistema venoso, pasan a los ventrículos y desde ahí salen a la circulación arterial.

La aurícula derecha y el ventrículo derecho se encargan de recibir la sangre que proviene de todo el cuerpo, que desemboca en la aurícula derecha a través de las venas cavas, superior e inferior. La aurícula izquierda y el ventrículo izquierdo reciben la sangre de la circulación pulmonar. Esta sangre está oxigenada y proviene de los pulmones. El ventrículo izquierdo la envía por la arteria aorta para distribuirla por todo el organismo.

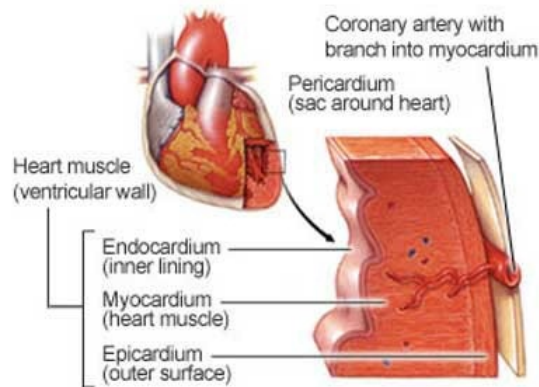


Figura 2.1: Capas del tejido cardíaco [23]

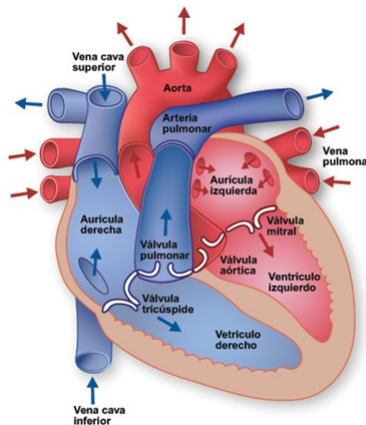


Figura 2.2: Anatomía cardíaca [28]

### 2.1.2. Función cardíaca

La función cardíaca consiste en la alternancia sucesiva de contracción (sístole) y relajación (diástole) de las paredes musculares de las aurículas y los ventrículos. Durante el periodo de relajación, la sangre fluye desde las venas hacia las dos aurículas, y las dilata de forma gradual. Sus paredes musculares se contraen e impulsan todo su contenido a través de los orificios auriculoventriculares hacia los ventrículos. Este proceso es rápido y se produce casi de forma simultánea en ambas aurículas. La sístole ventricular sigue de inmediato a la sístole auricular. La contracción ventricular es más lenta, pero más enérgica. Las cavidades ventriculares se vacían casi por completo con cada sístole. Después de que se produzca la sístole ventricular



el corazón queda en completo reposo durante un breve espacio de tiempo

## **2.2. Las unidades elementales del miocardio: los cardiomiocitos**

### **2.2.1. Estructura**

El músculo cardíaco es un tipo de músculo estriado que forman las paredes del corazón y que en conjunto constituye el miocardio. A pesar de que los músculos cardíacos son involuntarios, se asemejan a los músculos esqueléticos en muchos aspectos. Ambos son similares en cuanto a la apariencia estriada y las propiedades de contracción (figura 2.3).

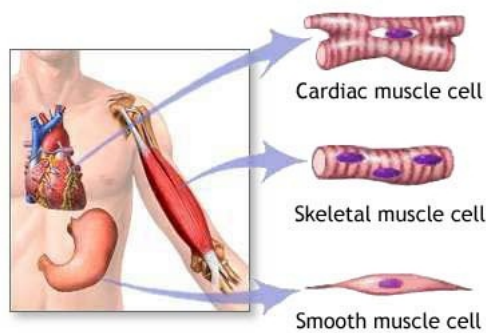


Figura 2.3: Diferencias entre los diferentes tejidos musculares [20]

Una de las características distintivas del músculo cardíaco estriado es que es ramificado, a diferencia del músculo esquelético, que tiende a ser lineal. Las células que componen el tejido cardíaco se denominan cardiomiocitos.

### **2.2.2. Composición**

Dentro de cada uno de los cardiomiocitos hay cientos de estructuras subcelulares denominadas miofibrillas. Cada miofibrilla, a su vez, está compuesta de numerosas sub-unidades moleculares denominadas sarcómeros (figura 2.4). El sarcómero es la unidad básica contráctil del cardiomiocito.

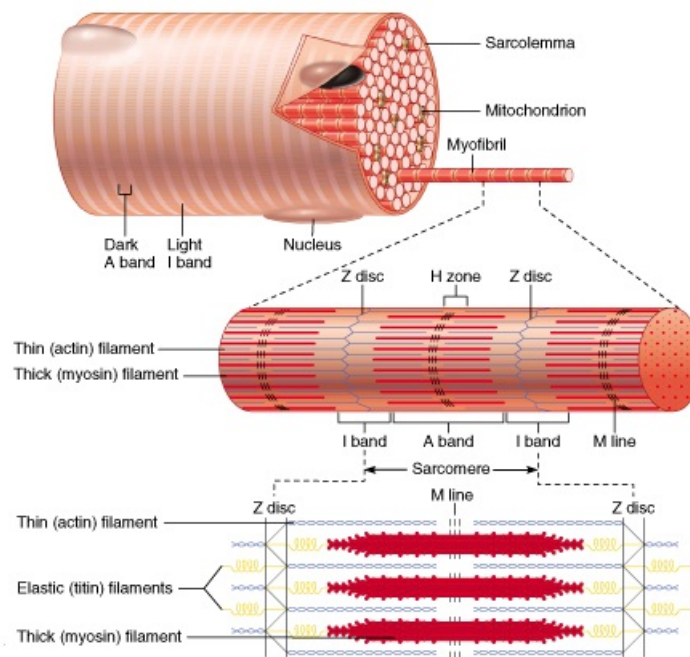


Figura 2.4: Estructura de las miofibras y sarcómeros [5]

El cardiomiocito está rodeado por una membrana citoplasmática denominada sarcolema. Los túbulos-T son extensiones del sarcolema que corren perpendiculares a la longitud de la fibra muscular. Es común que estos canales tubulares se ramifiquen y extiendan a lo largo de las miofibras en el sarcolema muscular. El resto de membrana entre los túbulos-T se denomina retículo sarcoplasmático. Los túbulos-T desempeñan un papel importante en durante la excitación-contracción que impulsa el corazón (figura 2.5).

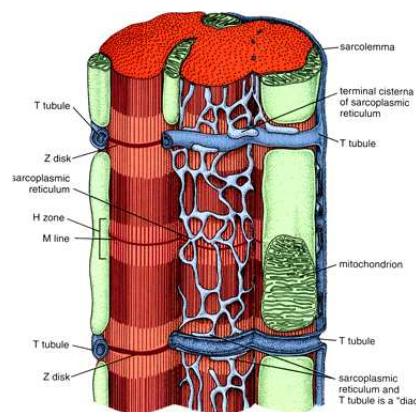


Figura 2.5: Detalle de una miofibrila de un cardiomiocito [13]

Dentro de cada cardiomiocito hay compartimentos llenos de calcio. El calcio es el responsable de la contracción muscular cardíaca, y todo este proceso se

conoce como homeostasis del calcio.

### **2.2.3. Electrofisiología**

Los potenciales de acción son los que inician la contracción del corazón. La contracción del músculo cardíaco se inicia de una forma diferente a la contracción del músculo esquelético. Mientras que en el caso del músculo esquelético es causada por impulsos eléctricos de las terminaciones nerviosas motoras, el corazón hace uso de su propio tipo de estímulo. Las células cardíacas se comunican directamente entre sí pasando el impulso eléctrico a sus vecinos a través de canales especiales llamados uniones-*gap*. Esto permite que el corazón sea estimulado sólo desde un punto mediante el impulso eléctrico que pasa al resto del músculo del corazón, haciendo que se contraiga.

El potencial de acción hace que los compartimentos de calcio de los cardiomiocitos entreguen el calcio a la célula. Este calcio permite que las células musculares individuales se contraigan.

La contracción cardíaca se mantiene hasta que la concentración de calcio intracelular vuelve a su nivel de reposo, con lo cual el músculo cardíaco se relaja. En el proceso de contracción-relajación intervienen un gran número de proteínas y moléculas. Particularmente, en este proyecto estudiaremos SERCA<sup>1</sup>. SERCA es la proteína encargada de eliminar el calcio del citoplasma<sup>2</sup> de la célula y causar la relajación del músculo cardíaco. Esta proteína se encuentra dentro del retículo sarcoplasmático.

## **2.3. Las unidades elementales de la maquinaria contráctil: el sarcómero**

### **2.3.1. Ultraestructura**

El cardiomiocito está formado por sub-unidades moleculares denominadas sarcómeros. Un sarcómero se define como el segmento entre dos discos Z (o

---

<sup>1</sup>SERCA: sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase

<sup>2</sup>El citoplasma es la parte de la célula comprendida entre la membrana y el núcleo

líneas Z) vecinas (ver figura 2.6). Los discos Z son un conjunto de proteínas denominadas *connectins* o CapZ, las cuales interconectan los filamentos finos con los sarcómeros adyacentes. Cada sarcómero se compone de banda A (banda compuesta por los filamentos gruesos) y bandas I (bandas compuestas por los filamentos finos). La banda A se subdivide en dos por la línea M (es la zona donde se produce la unión entre filamentos gruesos) y la zona H, mientras que la banda I se subdivide por los discos Z.

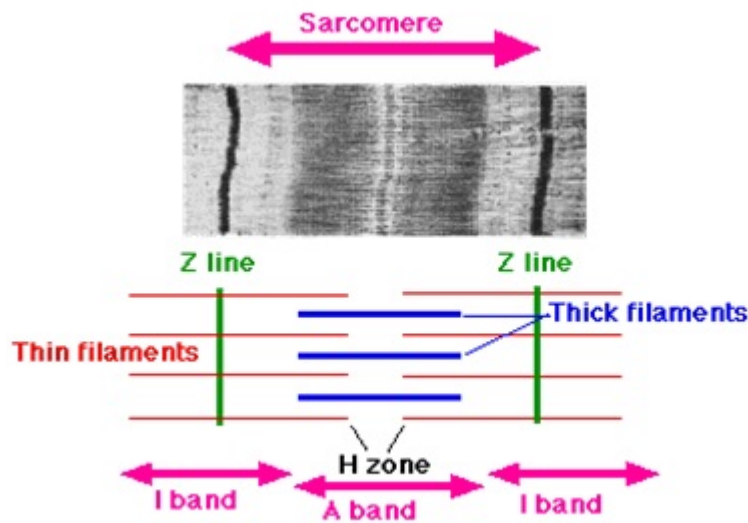


Figura 2.6: Estructura del sarcómero (imagen obtenida mediante microscopía de electrones)

### 2.3.2. Composición

Cada sarcómero se compone de filamentos finos y filamentos gruesos. Cada uno de los filamentos finos se compone de una proteína llamada actina y cada uno de los filamentos gruesos se compone de una proteína llamada miosina. Cada filamento de miosina está compuesto por alrededor de 200 moléculas de miosina.

### 2.3.3. Función

Durante la contracción cardíaca el calcio permite que las cabezas de miosina se unan a los filamentos de actina y tiren de ellos mediante un proceso

llamado *power stroke*. Es así como el potencial de acción hace que las células musculares individuales se contraigan.

La microscopía de segundo armónico (SHG) es una de las técnicas de imagen utilizadas en este proyecto porque es de extrema utilidad en el estudio del miocardio ya que permite la visualización de los sarcómeros de forma natural, sin protocolos de tinción. Tanto ésta como otras técnicas de microscopía vienen descritas en el siguiente capítulo.



# Capítulo 3

## Microscopía

### 3.1. Historia de la microscopía

**E**L microscopio fue inventado hacia los años 1610, por Galileo Galilei, según los italianos, o por Zacharias Janssen, en opinión de los holandeses. El tipo más común y el primero que se inventó es el microscopio óptico (figura 3.1). Se trata de un instrumento óptico que contiene una o varias lentes que permiten obtener una imagen aumentada del objeto y que funciona por refracción.



Figura 3.1: Primer microscopio óptico [21]

En 1665 Hooke observó con un microscopio un delgado corte de corcho y notó que el material era poroso y, en su conjunto, formaban cavidades poco profundas a modo de cajas a las que llamó células. Se trataba de la primera

observación de células muertas. Unos años más tarde, Malpighi, anatomista y biólogo italiano, observó células vivas. Fue el primero en estudiar tejidos vivos al microscopio.

La precisión de este instrumental va acrecentándose y es en el año 1900 cuando Carl Zeiss comienza a fabricar microscopios pensados para disección de cuerpos, tanto animales, como vegetales o humanos. Su precisión comenzó a alcanzar a microorganismos, bacterias y virus permitiendo descubrimientos que salvarían a la humanidad de expandir pestes y enfermedades letales, y alcanzando un grado de especificidad y precisión en las investigaciones que hubiera sido imposible de otra manera.

A principios de 1930 se había alcanzado el límite técnico en cuanto a microscopios ópticos se refiere, no consiguiendo aumentos superiores a 500 % o 1000 %. De todas formas, se tenía el deseo científico de observar los detalles de las estructuras celulares.

Históricamente el microscopio fue un invento que contribuyó mucho a una rama que es fundamental para la vida del ser humano, la medicina. A través de ellos se pudieron observar las primeras células cancerígenas, por ejemplo, permitiendo de esta forma estudiar una compleja enfermedad y desarrollar métodos para contrarrestarla. También influyó mucho en ramas como la biología y la paleontología, dándonos la posibilidad de saber de dónde venimos y conocer con qué tipo de naturaleza estamos conviviendo.

## **3.2. Técnicas modernas**

### **3.2.1. Microscopía confocal**

El concepto de imagen confocal fue patentado por Marvin Minsky en 1957. En un microscopio de fluorescencia convencional (p.ej., de campo amplio), el espécimen entero está sobresaturado de luz a partir de la fuente de iluminación. Debido a la conservación de la intensidad de la luz en su recorrido, todas las partes del espécimen a lo largo de su ruta óptica serán excitadas y la fluorescencia detectada por un fotodetector o una cámara. Por el contrario, un microscopio confocal utiliza iluminación puntual y un *pinhole* en un plano óptico conjugado en frente del detector para eliminar la



información que está fuera del plano focal. Sólo la luz que está dentro de este plano puede ser detectada, de modo que la calidad de imagen es mucho mejor que las de campo amplio. Puesto que sólo se ilumina un punto cada vez en el microscopio confocal, se requiere una exploración sobre un barrido regular en el espécimen para obtener imágenes bi o tridimensionales.

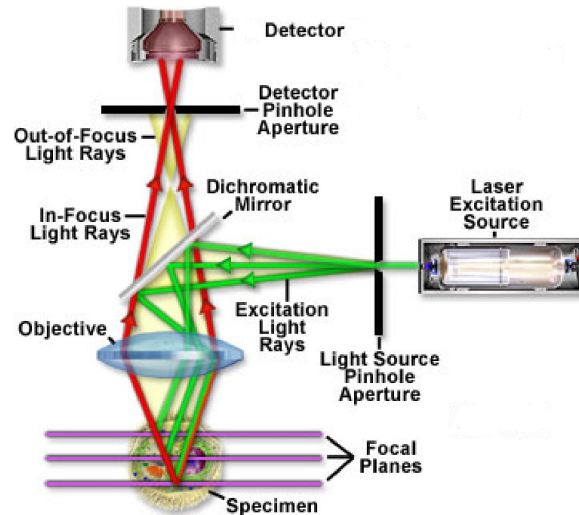


Figura 3.2: Esquema de un microscopio confocal

### 3.2.1.1. Principio físico

La microscopía de fluorescencia es la técnica confocal más utilizada aunque también es posible usarlo en reflexión. La fluorescencia requiere que los objetos de interés sean fluorescentes para poder usar este mecanismo de contraste y formar una imagen. La fluorescencia es la emisión de luz que ocurre nanosegundos después a la absorción de luz y que es típicamente de una longitud de onda menor. Las moléculas que se utilizan en virtud a sus propiedades fluorescentes se llaman fluoróforos [17].

En la microscopía de fluorescencia tradicional, se utiliza un único fotón para excitar una molécula desde su estado fundamental a un estado de energía superior. Cuando un fluoróforo absorbe luz, toda la energía que posee el fotón se transfiere al fluoróforo.

La relación entre la energía del fotón ( $E$ ), frecuencia ( $\nu$ ) y la longitud de onda ( $\lambda$ ) viene dada por la siguiente ecuación:

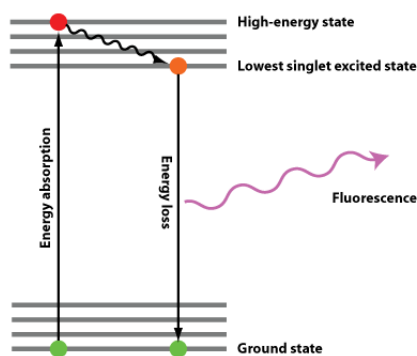


Figura 3.3: Diagrama de energía[6]

$$E = h \cdot \nu, \nu \cdot \lambda = c, \lambda = \frac{hc}{E}$$

La probabilidad de que un fluoróforo absorba un fotón se denomina coeficiente de extinción molar,  $\varepsilon$ , en unidades de  $M^{-1}cm^{-1}$ . El valor de  $\varepsilon$  se especifica para la longitud de onda a la cual se obtiene el máximo de absorción.

### 3.2.2. Microscopía de fluorescencia de dos fotones

La microscopía de excitación de dos fotones (2PEF) es una variante de la microscopía multifotónica. La microscopía de fluorescencia multifotónica se basa en la absorción simultánea de varios fotones de baja energía por una molécula. Mientras que la energía de cada uno de los fotones de baja energía es insuficiente para excitar un electrón, la suma de éstas es suficiente para elevar un electrón al estado de excitación y así estimular la fluorescencia. Este proceso fue predicho teóricamente en la tesis doctoral de María Goeppert - Mayer en 1931, parte del trabajo por el cual obtuvo el primer Premio Nobel en física teórica concedido a una mujer.

Al fin de estimular una transición electrónica, los fotones deben llegar al fluoróforo con una diferencia de tiempo entre ellos aproximada de cientos de attosegundos ( $10^{-16} s$ ), que en la mayoría de circunstancias es un evento muy poco probable. Debido a esto, para generar una cantidad detectable de fluorescencia se requiere un enorme flujo de fotones. Consecuentemente, no fue hasta el desarrollo, 30 años después, de láseres suficientemente

potentes que se pudo validar experimentalmente las predicciones de *Goeppert - Mayer*. Sin embargo, la gran potencia de estos láseres precoces eran también incompatibles con el material biológico. Es por ello que se tuvo que esperar otros 30 años más para empezar a utilizar la microscopía de fluorescencia multifotónica en material biológico. Esto fue posibles gracias al desarrollo de los sistemas de láser pulsado ultra corto.

La microscopía de dos fotones fue desarrollada por Winfried Denk en 1990 en el laboratorio de Watt W. Webb en la Universidad de Cornell. Él combinó la idea de absorción de dos fotones con el uso de un láser de barrido [12].

### 3.2.2.1. Principio físico

El concepto de la microscopía de excitación de dos fotones está basado en la idea de que dos fotones de energía baja pueden excitar un fluoróforo en un evento cuántico, resultando en la emisión de un fotón fluorescente, típicamente con una energía mayor a la de cualquiera de los dos fotones de excitación. Cada fotón aporta aproximadamente la mitad de la energía necesaria para excitar una molécula [27].

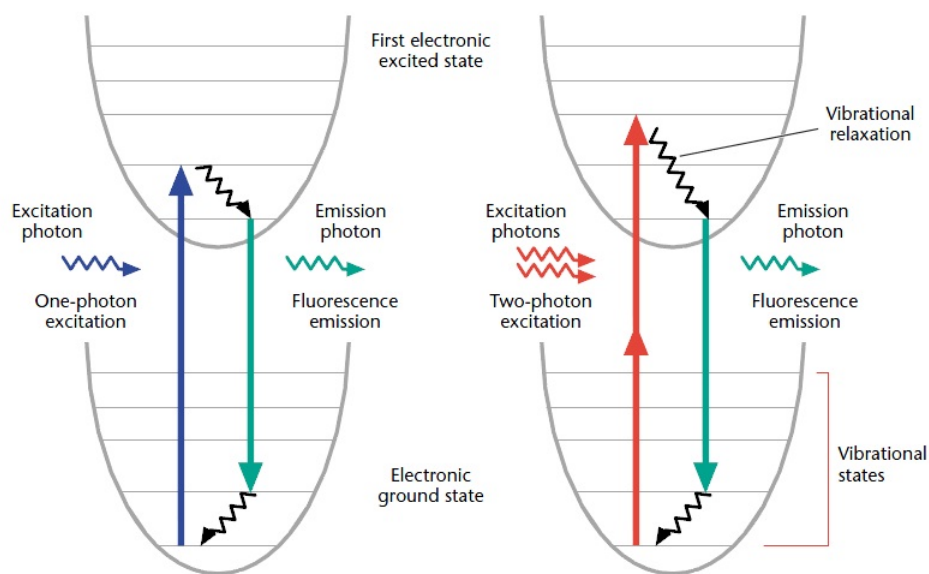


Figura 3.4: Diagrama de excitación de un fotón (izquierda) y de dos fotones (derecha) [27]

### 3.2.3. Microscopía segundo armónico

La Generación de Segundo Armónico (SHG) es una nueva modalidad de imagen óptica no lineal para la obtención de imágenes de alta resolución de tejidos, incluyendo piel, hueso, tendón y músculo.

La Generación de Segundo Armónico se demostró por primera vez en cuarzo cristalino en 1962 por Kleinman y desde entonces ha sido comúnmente utilizada para doblar la frecuencia de los láseres pulsados para obtener longitudes de onda cortas. En 1974, la técnica de SHG fue integrada por Hellwarth en un microscopio óptico para visualizar la estructura cristalina microscópica en policristalino. Este concepto fue demostrado en la década de 1970 y de nuevo en la década de 1990 con más equipos de imagen moderna y láser. Los primeros experimentos de imágenes de SHG biológicas fueron realizados por Freund en 1986. Ellos utilizaron SHG para el estudio de la orientación de las fibras de colágeno en tendón de la cola de una rata, con una resolución de  $50\text{ }\mu\text{m}$ .

Pero no fue hasta 1996 que se acabó de desarrollar la técnica de generación de segundo armónico para la visualización de células vivas, por Paul J. Campagnola en los laboratorios de *The University of Connecticut Health Center* [8, 9].

SHG es una técnica complementaria a la excitación de dos fotones (2PEF) ya que utilizan un mecanismo de contraste diferente y es más fácil de detectar en el camino óptico de transmisión de luz.

#### 3.2.3.1. Principio físico

SHG no surge de un proceso de absorción como sucedía con 2PEF. En su lugar, un campo intenso de láser induce una polarización no-lineal de segundo orden en el conjunto de moléculas, lo que resulta en la producción de una onda coherente a exactamente el doble de la frecuencia incidente (o la mitad de la longitud de onda). Esto hace que en comparación con 2PEF no exista pérdida de energía durante las transiciones de fotones.

La polarización inducida puede expresarse como:

$$\vec{P}(t) = \varepsilon_o \cdot (\chi^{(1)} \vec{E}(t) + \chi^{(2)} \vec{E}(t) \vec{E}(t) + \chi^{(3)} \vec{E}(t) \vec{E}(t) \vec{E}(t) + \dots)$$

donde  $\vec{P}$  es la polarización inducida,  $\varepsilon_o$  es la permitividad en el vacío,  $\chi^{(n)}$  es el tensor de susceptibilidad no-lineal de orden  $n$ th, y  $\vec{E}$  es el vector de campo de la luz incidente. El primer término describe la absorción normal y reflexión de la luz, el segundo término, SHG, la suma, y la diferencia de la generación de frecuencia, y el tercero, tanto la absorción de dos y tres fotones como la generación del tercer armónico.

La mayor restricción de SHG es el requerimiento de un entorno no centrosimétrico. Esto es fácilmente comprensible si miramos la siguiente expresión, en términos de la expansión del dipolo eléctrico:

$$\vec{P}(t) = \chi^{(2)} \vec{E}(t) \vec{E}(t)$$

donde la polarización y el campo eléctrico son cantidades vectoriales. Como la onda de SHG es una cantidad vectorial, la polarización inducida en todas las direcciones en una muestra centrosimétrica sería igual y opuesta, y por lo tanto, el producto de vectores daría cero.

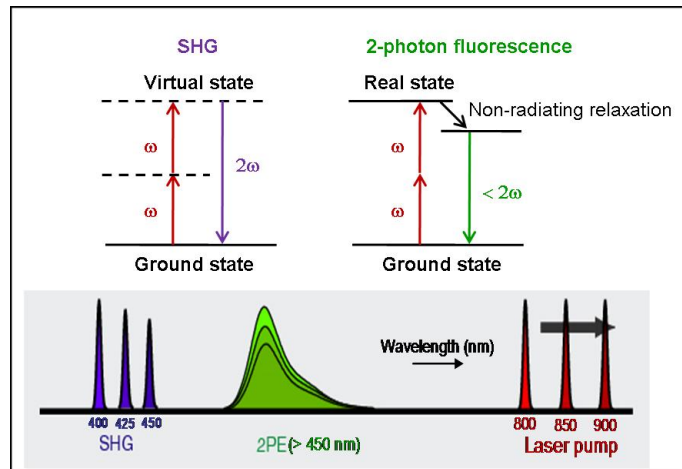


Figura 3.5: Comparación de SHG con 2PE fluorescence [24]

## 3.3. Aplicaciones para observar el miocardio

### 3.3.1. Fluorescencia (single-photon y two-photon)

La señal de fluorescencia (single-photon) requiere excitar la muestra con láseres específicos según el fluoróforo que utilizemos. Para visualizar el tejido del miocardio mediante 2PEF se utiliza normalmente un láser de Titanio-Zafiro que tiene un anchura de pulso de 100-200 femtosegundos y una frecuencia de repetición de unos 80 MHz, permitiendo que la densidad de fotones sea alta y así obtener el flujo necesario para la absorción de dos fotones. Este láser trabaja a una longitud de onda de entre 700 - 950 nm. La señal de fluorescencia recibida está comprendida entre los 450 - 600 nm (ver figura 3.11).

Mediante la microscopía de fluorescencia tanto de un fotón como de dos fotones, y utilizando un tinte adecuado podemos observar diferentes componentes del tejido del miocardio. En la figura 3.6 se puede observar una imagen tomada con el microscopio confocal de una sección de ventrículo izquierdo, pasando a través de un vaso sanguíneo. La señal en color rojo es la señal de fluorescencia obtenida mediante microscopía de excitación de dos fotones. Los objetos con forma redonda que se encuentra en el centro de la imagen son glóbulos rojos.

En concreto, para este proyecto nos centraremos en la visualización de la distribución de SERCA en el retículo sarcoplasmático. En la figura 3.7 se puede ver una imagen obtenida con nuestro microscopio.

#### 3.3.1.1. Ventajas e inconvenientes

En el caso de la microscopía confocal de fluorescencia convencional, pueden ocurrir problemas graves cuando se trabaja con muestras biológicas. Uno de los problemas es el *photobleaching*<sup>1</sup> del marcador de fluorescencia. Debido a la pequeña apertura del confocal, se bloquea la mayor parte de la luz emitida por el tejido, incluida la luz procedente del plano de enfoque. Por ello, el láser de excitación tiene que ser muy brillante para conseguir una buena relación

---

<sup>1</sup>Es la destrucción fotoquímica del fluoróforo

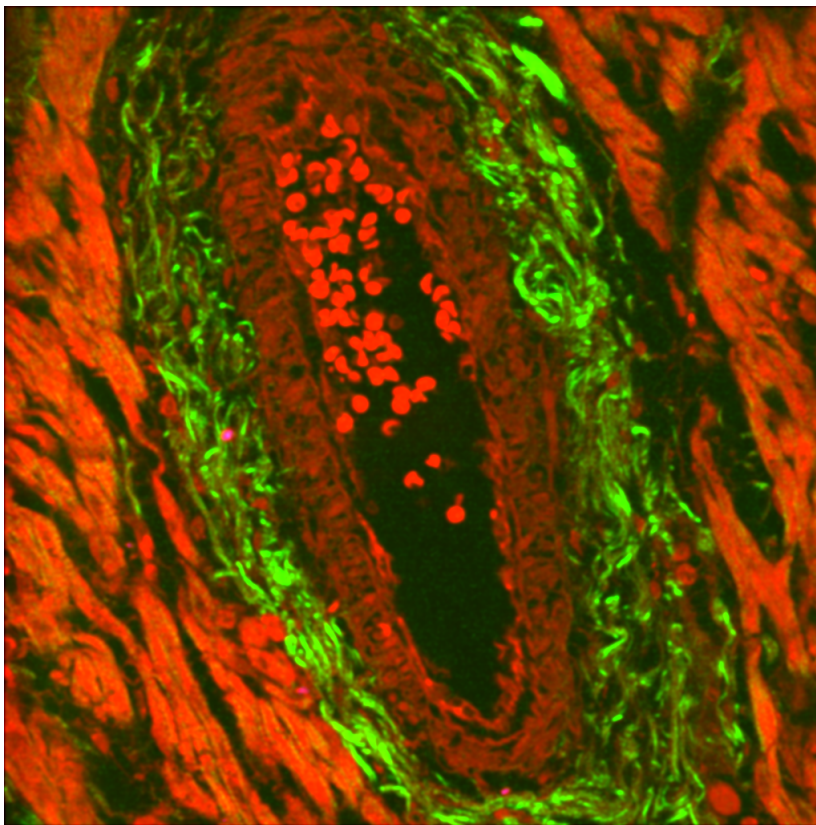


Figura 3.6: Sección de ventrículo izquierdo pasando a través de un vaso sanguíneo

señal a ruido. Esto causa una desaparición de la fluorescencia en cuestión de minutos durante un escaneo continuo. De este modo, la señal de fluorescencia se va debilitando a medida que se realizan escaneos continuos.

La foto-toxicidad es otro problema. Muchas moléculas del marcador de fluorescencia generan cito-toxinas como el oxígeno *singlet* o radicales libres, y hay que limitar el tiempo de escaneo o la intensidad de la luz para mantener la muestra viva.

La microscopía multifotónica resuelve los problemas de la microscopía confocal convencional: mejora la relación señal a ruido mediante la eliminación de la fluorescencia (figura 3.8), excepto en el punto focal del láser y reduce o elimina el *photobleaching* y la foto-toxicidad gracias al uso de menor potencia. Esto se consigue gracias al uso de un láser ultra rápido con una potencia de pico muy alta, pero una potencia media más baja. Además no se necesita de ninguna apertura confocal ya que toda la luz fluorescente se origina desde el punto de enfoque del láser.



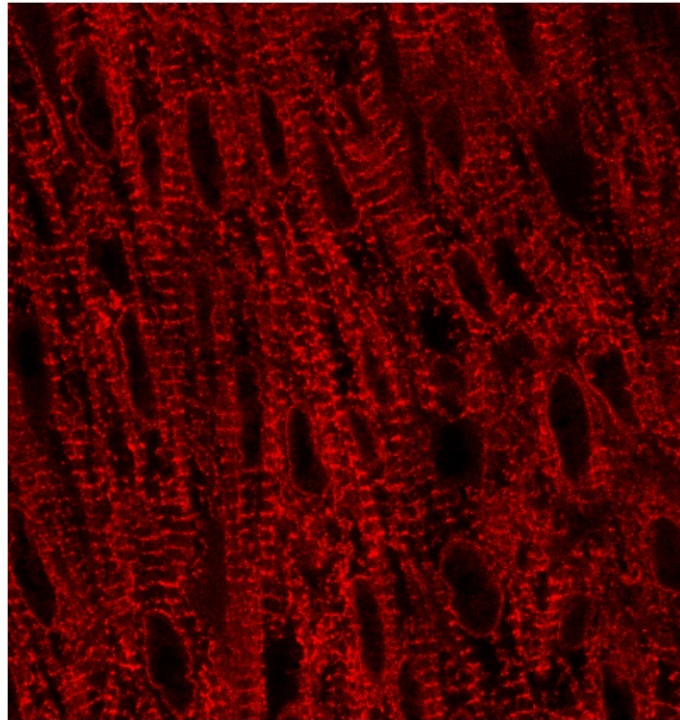


Figura 3.7: Distribución de SERCA en el retículo sarcoplasmático

En el caso confocal, la fluorescencia se produce en toda la muestra y debe ser bloqueada por un *pinhole*. El microscopio de multifotones solo excita el plano focal, por lo que no hace falta *pinhole*, ya que la luz que emite la muestra procede ya de un solo plano (figura 3.9). Gracias a ello, se puede situar un detector externo cerca de la muestra que recoge más eficientemente la luz. Además dado que la longitud de onda de excitación es mayor en el caso del multifotón, se pierde menos luz de excitación por dispersión.

Pero no todo son ventajas. Las principales limitaciones de la microscopía multifotónica son

- Solamente es adecuada para imágenes de fluorescencia. No es posible obtener imágenes de luz reflejada con lo cual su aplicabilidad es limitada.
- No es adecuada para imágenes de células altamente pigmentadas y tejidos que absorben la luz del infrarrojo cercano con lo cual no se puede trabajar a todas las longitudes de onda deseadas.



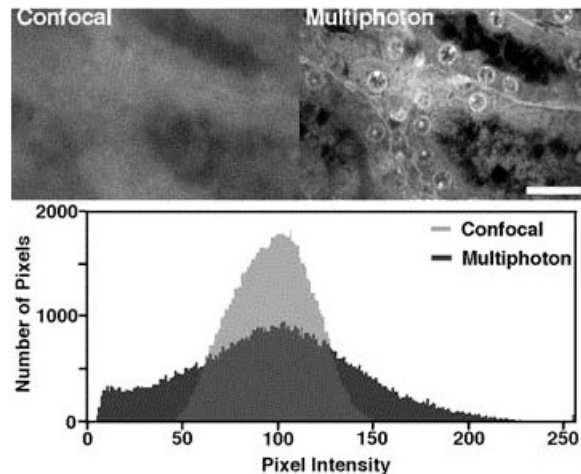


Figura 3.8: Diferencias de calidad de imagen entre microscopio confocal y de multifotones [18]

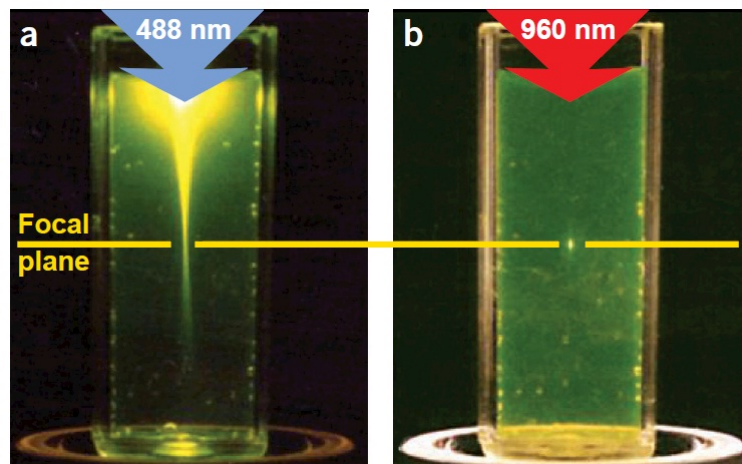


Figura 3.9: Área de excitación en un microscopio confocal y en un microscopio de multifotones [29]

- A día de hoy es una técnica microscópica muy cara.

### 3.3.2. SHIM (Second Harmonic Imaging)

Como ya se ha comentado, la microscopía de Generación de Segundo Harmónico (SHG) obtiene su contraste de la habilidad de un espécimen para generar luz de segundo armónico. Este fenómeno sólo se consigue en estructuras no centrosimétricas. Es por eso que se requiere que el material tenga una orientación molecular específica para que se puede doblar la frecuencia, es decir, los materiales han de ser altamente polarizables.

Los materiales biológicos principales que cumplen esta característica son los filamentos de miosina, el colágeno, los microtubulos y la celulosa. Por lo tanto mediante SHIM podemos observar el complejo actino-miosina de los cardiomiocitos. En la figura 3.10 se observa una imagen de un cardiomiocito obtenido mediante la técnica de SHG con nuestro microcopio.

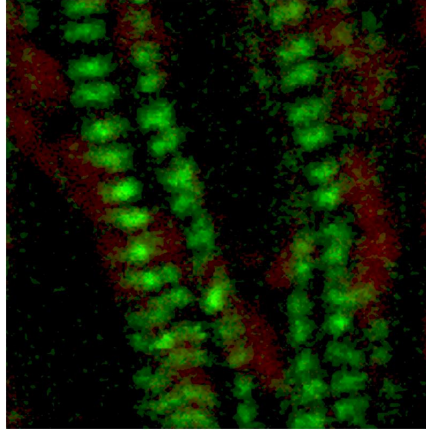


Figura 3.10: Imagen de un cardiomiocito en detalle obtenido mediante SHG

#### **3.3.2.1. Ventajas y inconvenientes**

SHIM ofrece varias ventajas en la visualización de células vivas y tejidos. SHG no implica la excitación de las moléculas como otras técnicas de microscopía de fluorescencia, por lo tanto, las moléculas no sufren los efectos de fototoxicidad o *photobleaching*. También, puesto que muchas estructuras biológicas producen señales intensas de SHG, no se necesitan marcar las moléculas con tintes que pueden alterar el funcionamiento de un sistema biológico.

Mediante el uso de longitudes de onda cercanas al infrarrojo, SHIM tiene la capacidad de construir imágenes tridimensionales de las muestras penetrando más profundamente en los tejidos.

El principal inconveniente es que mediante SHG no podemos visualizar todo tipo de tejidos, sino sólo aquellos que presenten las propiedades necesarias de orientación y simetría.

Gracias a que la generación de segundo armónico es complementaria a la fluorescencia por excitación de dos fotones, podemos obtener mediante el

mismo microscopio, simultáneamente, imágenes de fluorescencia del tejido y de SHG. En la figura 3.11 se observa el diagrama de señal de excitación y señal recibida de nuestro microscopio de multifotones.

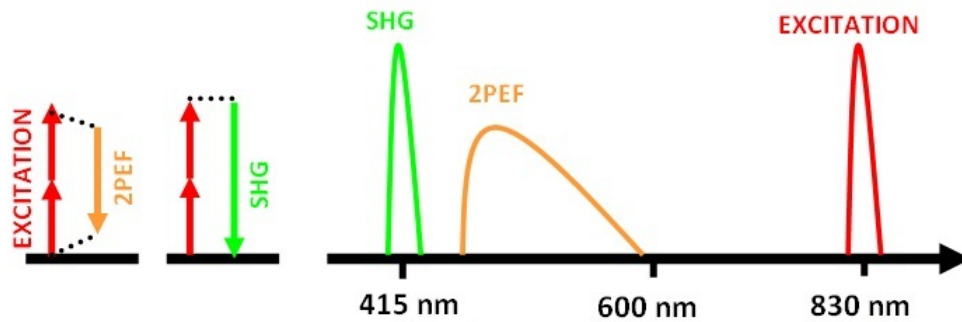


Figura 3.11: Diagrama señal excitación y señal obtenida de SHG y 2PEF

Esta propiedad permite la visualización simultánea de la distribución de SERCA y los cardiomiocitos, de una sección de tejido. En la figura 3.12 se observa una imagen de tejido del miocardio obtenida con el microscopio multifotónico en la cual, en rojo se observa al distribución de SERCA en el retículo sarcoplasmático (2PEF), en verde los cardiomiocitos (SHG) y en azul los mitocondrios (2PEF).

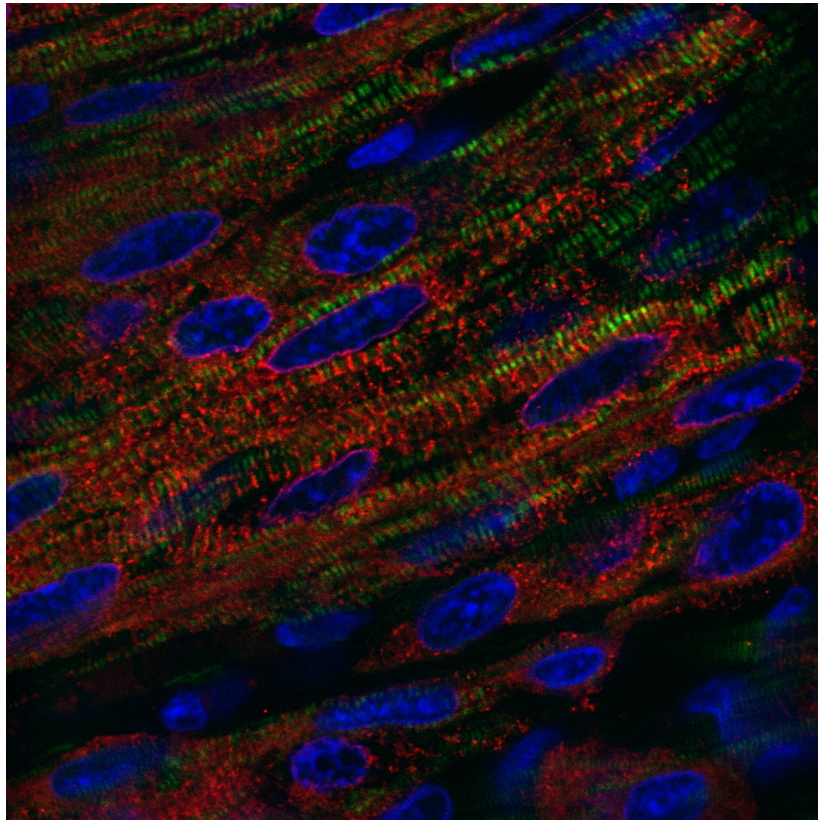


Figura 3.12: Imagen de tejido del miocardio. En rojo y azul señal de 2PEF (obtenida cada una mediante diferentes tintes) y en verde señal de SHG.

## Capítulo 4

# La restricción de crecimiento induce un remodelado cardiovascular

### 4.1. Prevalencia de la enfermedad

**L**A restricción de crecimiento afecta al 5-10 % de los neonatos y está asociado con un aumento de la mortalidad por motivos cardiovasculares en adultos. Un estudio reciente demuestra que la restricción de crecimiento induce cambios en la morfología cardíaca, disfunción cardíaca longitudinal y remodelado arterial, y todo ello crece linealmente con el grado de severidad de restricción de crecimiento [10].

El hallazgo más relevante de este estudio es que los neonatos que presentan restricción de crecimiento tienen una forma y geometría cardíaca distinta, con unos ventrículos menos alargados y más abombados. Estos cambios vienen inducidos por las condiciones durante el desarrollo fetal. La hipoxia crónica intrauterina y la baja nutrición debido a CIR resultan en una sobrecarga en el volumen y presión del corazón fetal, lo que induce alteraciones en la función cardíaca.

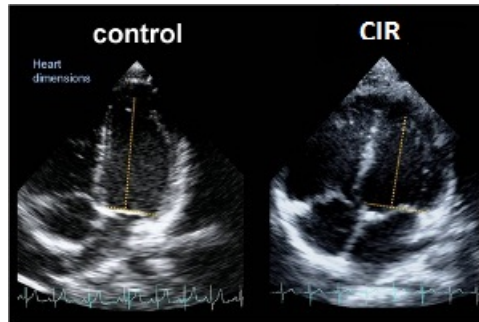


Figura 4.1: Diferencias en la forma del corazón fetal [10]

## 4.2. Remodelado cardiovascular

Clásicamente se ha considerado el remodelado cardíaco como el conjunto de cambios que suceden en el tamaño, la forma y la función del corazón en respuesta a una lesión cardíaca o a un aumento de la carga. Aunque inicialmente el remodelado es un mecanismo compensatorio para adaptar el corazón a diferentes situaciones de carga, con el tiempo se puede hacer patológico al no lograr compensar dichas situaciones y continuar su progresión natural. El remodelado consiste fundamentalmente en una serie de cambios anatómicos y funcionales. Dichos cambios tienen una base celular y molecular, lo que lleva a modificaciones considerables de la estructura y función de los miocitos cardíacos, pero no sabemos qué ocurre antes.

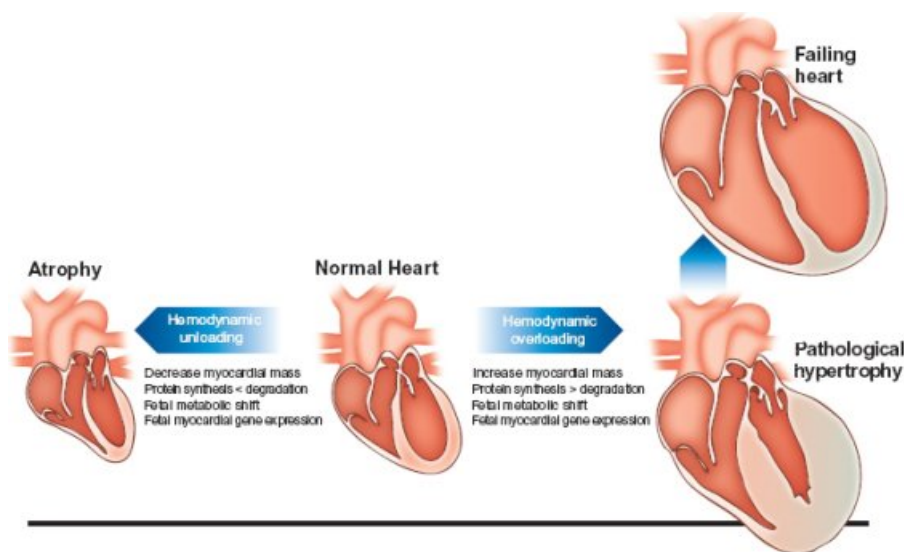


Figura 4.2: Remodelado cardiaco según daño [2]



### 4.3. Modelo animal de restricción de crecimiento

La restricción de crecimiento intrauterina (CIR) debido a la insuficiencia placentaria está asociada con un incremento de la mortalidad y daño neurológico. Aunque reproducir las características de las condiciones humanas en un modelo experimental es una tarea difícil, el uso de modelos animales es esencial para mejorar la comprensión de los mecanismos de los sucesos clave.

El conejo como modelo animal se ha usado previamente para estudiar la restricción de crecimiento intrauterina (CIR) [4]. Es un modelo animal económico y asequible que además presenta unas características que resultan ser muy ventajosas respecto otros modelos animales que han sido usados para estudiar la restricción de crecimiento como las ratas o las ovejas.

El modelo animal de restricción de crecimiento utilizado en este estudio se basa en la ligadura de los vasos uteroplacentarios que reducen el aporte de nutrientes y oxígeno a los embriones. De esta forma, de una misma coneja se obtienen controles (fetos a los que no se les ha practicado la cirugía) y casos con restricción de crecimiento fetal (CIR) [15].

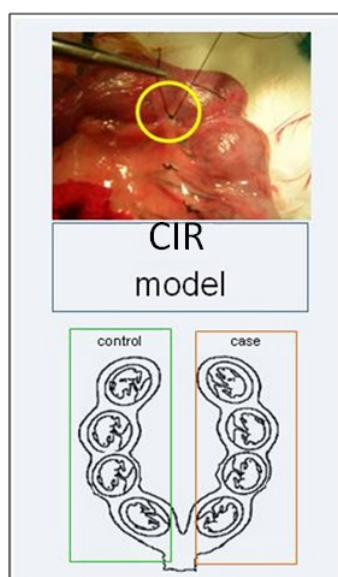


Figura 4.3: Modelo animal de restricción de crecimiento

## **4.4. Correlación entre la patología del humano y el modelo animal**

Al igual que ocurre en los humanos, la placenta de una coneja es discoide (redonda), vellosa y hemocorial<sup>1</sup>. Además en lo que a tiempos de maduración de la sustancia blanca del cerebro se refiere, los conejos se parecen más a los humanos, ya que en ambos la maduración cerebral empieza en el útero y continúa durante los primeros años de vida.

Por lo tanto, el modelo utilizado simula el embarazo humano, ya que se basa en una reducción del suministro a la placenta, induciendo una restricción combinada de oxígeno y nutrientes. Los modelos CIR basados en la restricción alimenticia no reproducen estas condiciones ya que no se considera el rol de la placenta. De acuerdo con este razonamiento, los modelos de desnutrición no dan lugar a incrementos consistentes de la mortalidad fetal, que en el ser humano es un suceso clave en la historia natural de la restricción de crecimiento.

Por último, el modelo permite ajustar el tiempo y la gravedad de la restricción del crecimiento fetal.

---

<sup>1</sup>la sangre de la madre entra en contacto directo con el corión (envoltura externa que recubre al embrión)



# Capítulo 5

## Descripción de la herramienta

### 5.1. Introducción

EL objetivo principal de este proyecto es desarrollar un conjunto de herramientas de procesamiento de imagen que se integren para formar una única que cuantifique diferentes parámetros morfométricos del tejido cardíaco, para posteriormente evaluar si existe o no un remodelador cardíaco a nivel celular.

Los parámetros morfométricos que se desean cuantificar son, en el caso de las imágenes de fluorescencia de la distribución de SERCA, la distancia entre localizaciones de SERCA (ver figura 5.2), y en el caso de las imágenes de SHG de cardiomiocitos, las distancias características del sarcómero (intra y intersarcomérica) (ver figura 5.1).

### 5.2. Herramienta 1: medida de distancias en estructuras fibrilares

La señal de fluorescencia de SERCA a lo largo de una fibra es una señal monoperiódica tal y como se muestra en la figura (ver figura 5.3).

En cambio la señal de SHG a lo largo de una fibra de sarcómeros, (ver figura 5.4), es biperiódica ya que existen dos periodicidades, una debida a

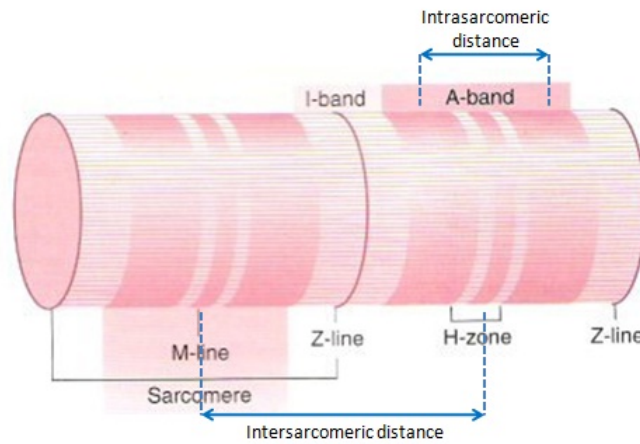


Figura 5.1: Longitud del sarcómero

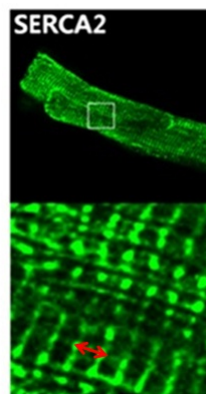


Figura 5.2: Localización de SERCA [26]

la distancia intrasarcomérica (distancia de la banda A) y la otra debida a la longitud del sarcómero (o distancia entre dos discos Z).

Por lo tanto, se tiene dos tipos de estructuras fibrilares periódicas de las cuales se desea obtener su período. Para poder calcular las periodicidades de manera automática se va a diseñar una herramienta que calcule de manera global el/los período/s correspondientes a las distancias promedio de cada imagen. El diseño de la herramienta está basado en dos aproximaciones tecnológicas: la transformada de Fourier y la autocorrelación. El desarrollo y validación de esta herramienta viene descrito en el capítulo siguiente (6).

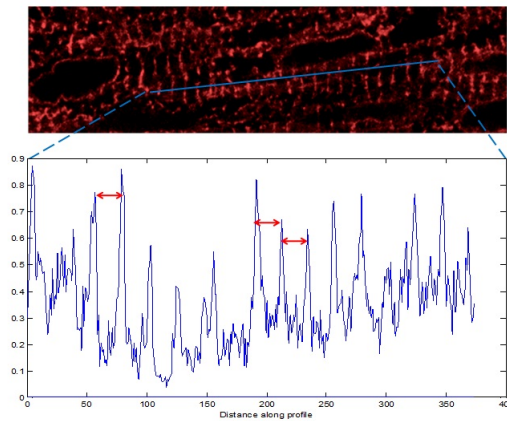


Figura 5.3: Señal de localizaciones de SERCA en la dirección de una fibra

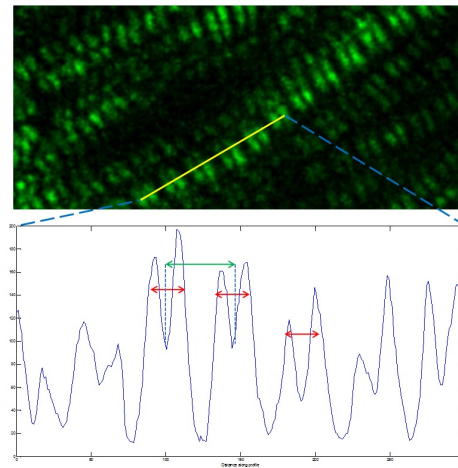


Figura 5.4: Señal de SHG de sarcómeros

### 5.2.1. Limitaciones previstas para la medida de distancias

Las limitaciones que se prevén para la herramienta de medida de distancias son las siguientes:

- Diferente contexto local: Dentro de una misma imagen encontramos fibras con diferentes orientaciones y fibras con diferentes distancias (ver figura 5.5). Debido a esto sería necesario hacer una medida más local.
- Interferencia en el caso biperiódico: la distancia intersarcomérica (distancia mayor) es un poco mayor del doble de la distancia

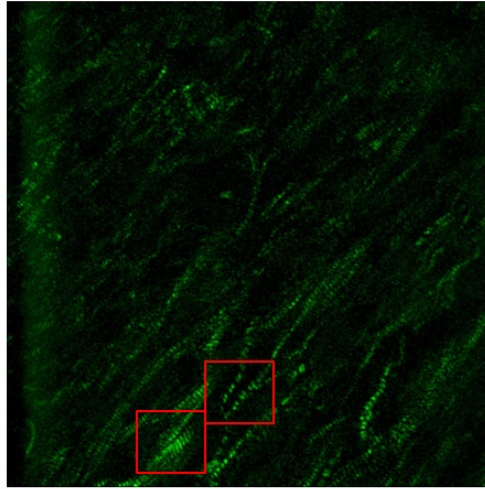


Figura 5.5: Imagen de sarcómeros con diferente contexto local

intrasarcomérica. Este hecho crea una interferencia que puede provocar un artefacto en la medida de la distancia intrasarcómerica, causando una variabilidad en la medida de ésta de un 10 % aproximadamente.

### **5.3. Herramienta 2: seguimiento de fibras**

Una imagen está compuesta por diferentes fibras que describen trayectorias diferentes. Con tal de realizar una medida de la distancia más correcta se va a diseñar una herramienta que siga las fibras de la imagen para así poder obtener el valor de las distancias promedio de cada fibra, es decir, se va a realizar una medida local de las distancias.

Por lo tanto, con esta herramienta se pretende hacer frente a la primera de las limitaciones existentes en la medida de distancias.

### **5.4. Herramienta 3: modelo paramétrico del sarcómero**

Para poder corregir la interferencia en el cálculo de la distancia intrasarcomérica se estudiará el efecto de la interferencia en condiciones ideales y se generará un modelo paramétrico del patrón biperiódico que viene

detallado en el capítulo 8. Mediante el estudio del modelo paramétrico se podrá extraer las características morfométricas del sarcómero (distancias inter y intrasarcoméricas) de imágenes obtenidas mediante SHIM de una sección de tejido y, además, conocer la variación de iluminación en una misma fibra.

Todas estas herramientas se integran para obtener una única herramienta capaz de proporcionar medidas morfométricas de secciones de tejido de miocardio (ver figura 5.6).

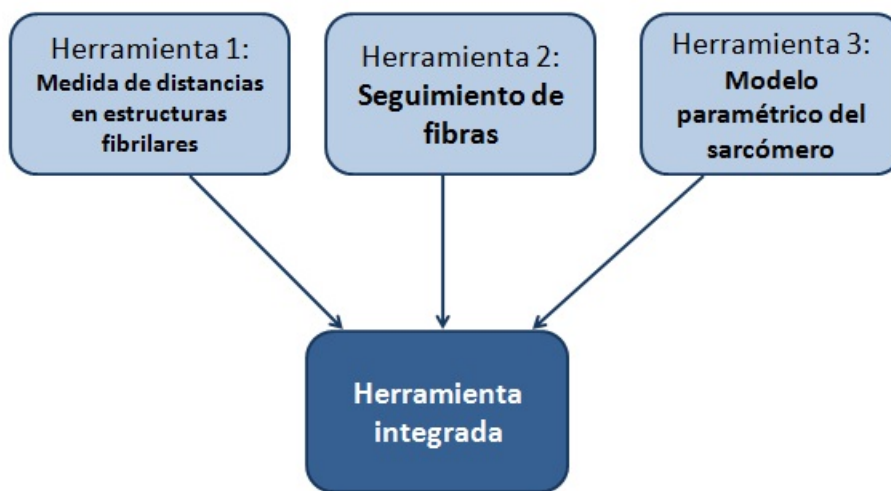


Figura 5.6: Herramienta integrada



# Capítulo 6

## Herramienta 1: Medida de distancias en estructuras fibrilares

### 6.1. Introducción

**E**N este capítulo se va a explicar el desarrollo de la herramienta que permitirá medir las distancias en las estructuras fibrilares del tejido cardíaco explicadas en el capítulo anterior, de la forma más automática posible. Una vez detallado el diseño, la herramienta se validará comparando las medidas manuales de distancias con las obtenidas con esta herramienta.

Las estructuras fibrilares que caracterizan el tejido cardíaco son estructuras periódicas. La primera herramienta de procesamiento en la que pensamos cuando queremos calcular el periodo de una señal periódica es en la transformada de Fourier ya que cualquier señal periódica se puede representar como una combinación lineal de funciones armónicas denominada “serie de Fourier”. De esta manera, uno de los enfoques tecnológicos adoptados es el cálculo de la transformada de Fourier en dos dimensiones para calcular las frecuencias deseadas. Pero ésta no es la única solución posible. Otra manera de obtener la información de las distancias es a través del cálculo de la autocorrelación ya que, si una señal es periódica, su función de autocorrelación también lo será y con el mismo periodo. Además si la señal está contaminada por ruido,

el cálculo de la autocorrelación puede reducir ese ruido gracias a una de las propiedades de la función de autocorrelación que se comentará más adelante.

Para el diseño de la herramienta se va a adoptar dos enfoques diferentes (Fourier y autocorrelación) comparando el comportamiento de ambas técnicas para así determinar, finalmente, cuál de las dos realiza el cálculo de las distancias de una manera más eficaz.

## **6.2. Cálculo de las distancias mediante transformada de Fourier**

### **6.2.1. Prueba de concepto**

Tal y como se ha comentado al principio de este capítulo, una de las técnicas adoptadas es la medida de las distancias mediante la extracción de la información frecuencial de la imagen. Si se calcula la transformada de Fourier en dos dimensiones de los dos tipos de imágenes se obtienen unas imágenes transformadas como las de la figura 6.1.

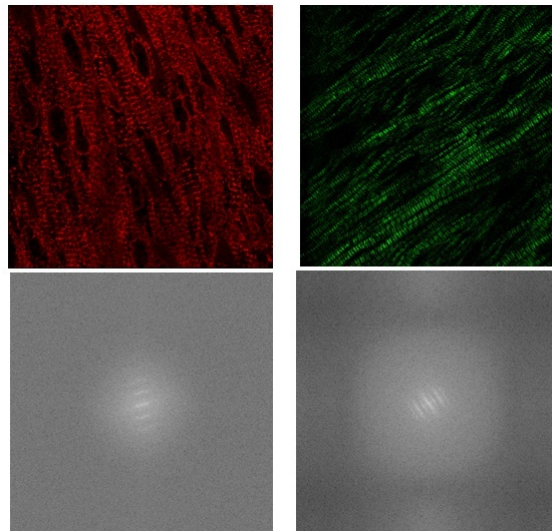


Figura 6.1: FFT de las imágenes de SERCA (izquierda) y cardiomiocitos (derecha)

En ambas imágenes transformadas se observan unas líneas de más intensidad que siguen una dirección que es perpendicular a la dirección



principal de las fibras. La línea de mayor intensidad es la que está justo en el centro y se corresponde a los valores de menor frecuencia. El resto de líneas paralelas corresponden a las frecuencias de interés y a sus respectivos armónicos.

Detectando la línea de mayor intensidad (central) se puede dibujar el perfil de las frecuencias en la dirección ortogonal a ésta y por lo tanto, en la dirección de interés. Una vez obtenido el perfil frecuencial se detectan los máximos ya que su posición se corresponde con las frecuencias deseadas. (ver figura 6.2).

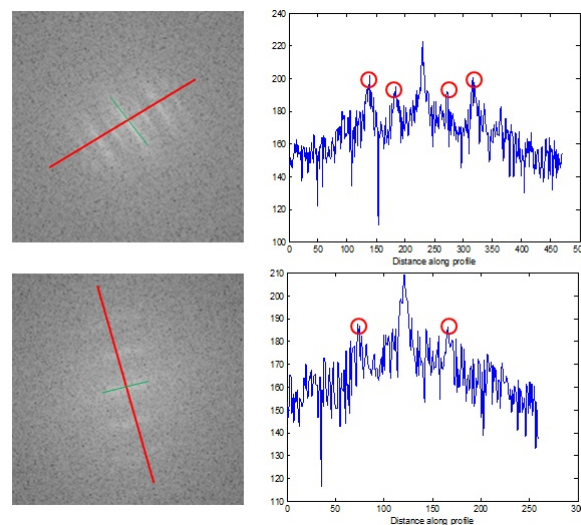


Figura 6.2: Ejemplo detección frecuencias de interés en fibras de sarcómeros (arriba), y SERCA (abajo)

### 6.2.2. La transformada de Fourier discreta

La idea básica de las series de Fourier es que toda función periódica de periodo  $T$  puede ser expresada como una suma trigonométrica de senos y cosenos del mismo período  $T$ . El problema aparece naturalmente en astronomía, de hecho Neugebauer (1952) descubrió que los Babilonios utilizaron una forma primitiva de las series de Fourier en la predicción de ciertos eventos celestiales. La historia moderna de las series de Fourier comenzó con D'Alembert (1747) y su tratado de las oscilaciones de las cuerdas del violín.

La transformada de Fourier en dos dimensiones de una señal continua se puede definir como:

$$\mathcal{F}\{f\} = F(u, v) = \iint_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) e^{-2\pi i(ux+vy)} dx dy$$

y su antitransformada como:

$$\mathcal{F}^{-1}\{F(u, v)\} = f(x, y) = \iint_{-\infty}^{+\infty} F(u, v) e^{+2\pi i(ux+vy)} du dv$$

Hemos de tener en cuenta que una imagen se caracteriza por ser una secuencia finita. Sin embargo, la transformada de Fourier continua, bien sea uni o bidimensional, de secuencias finitas (y por tanto, representables por un número finito de valores), no ofrece una representación eficiente en el dominio de la frecuencia. Por tanto, hemos de recurrir a una nueva versión de la transformada de Fourier: se trata de la transformada discreta de Fourier (DFT <sup>1</sup>). La DFT representa a una secuencia finita en el dominio de la frecuencia con un número finito de valores. Por tanto, la DFT sirve como aproximación a la transformada continua y puede calcularse eficientemente por medio de algoritmos FFT <sup>2</sup>. La DFT bidimensional se calcula de la siguiente manera:

$$F(k, l) = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} f(m, n) e^{-j\frac{2\pi}{M}km} e^{-j\frac{2\pi}{N}ln}, 0 \leq k \leq M-1, 0 \leq l \leq N-1$$

y su antitransformada como:

$$f(m, n) = \frac{1}{MN} \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{l=0}^{N-1} F(k, l) e^{j\frac{2\pi}{M}km} e^{j\frac{2\pi}{N}ln}, 0 \leq k \leq M-1, 0 \leq l \leq N-1$$

### 6.2.2.1. Propiedades de la transformada de Fourier discreta

Las propiedades más importantes de la transformada de Fourier discreta 2D son las siguientes:

---

<sup>1</sup>DFT: del inglés Discrete Fourier Transform

<sup>2</sup>FFT: del inglés Fast Fourier Transform

- **Separabilidad:** Las ecuaciones del par transformado DFT pueden expresarse de forma separada. La principal ventaja que ofrece esta propiedad es que tanto la secuencia original como la transformada pueden obtenerse en dos pasos aplicando transformadas de Fourier unidimensionales:  $F(k, l) = \frac{1}{M} \sum_{m=0}^{M-1} F(m, l) e^{-j \frac{2\pi}{N} km}$ , con  $F(m, l) = \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} f(m, n) e^{-j \frac{2\pi}{N} ln}$
- **Traducción:**  $f(m, n) e^{-j \frac{2\pi}{N} (k_0 m + l_0 n)} \leftrightarrow F(k - k_0, l - l_0)$
- **Traducción en el otro ámbito/dominio:**  $f(m - m_0, n - n_0) \leftrightarrow F(k, l) e^{-j \frac{2\pi}{N} (km_0 + ln_0)}$
- **Cambio de escala:**  $\mathcal{F}\{f(am, bn)\} = \frac{1}{|a|} \cdot F(\frac{k}{a}, \frac{l}{b})$
- **Distributividad:**  $\mathcal{F}\{af_1(m, n) + bf_2(m, n)\} = a\mathcal{F}\{f_1(m, n)\} + b\mathcal{F}\{f_2(m, n)\}$
- **Convolución:**  $f(m, n) * g(m, n) \longleftrightarrow F(k, l) \cdot G(k, l)$  y viceversa
- **Periodicidad y simetría conjugada:** La transformada discreta de Fourier y su inversa son periódicas de período N, es decir:  $F(k, l) = F(k + \alpha N, l) = F(k, l + \beta N)$  con  $\alpha, \beta = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$

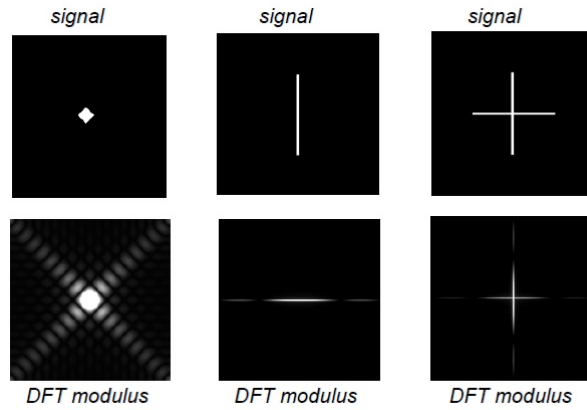


Figura 6.3: Ejemplos de transformadas de Fourier de señales 2D [19]

### 6.2.3. Algoritmo para el cálculo de las distancias

El algoritmo que se ha diseñado para calcular las distancias es el que se muestra en la figura (ver figura 6.4)

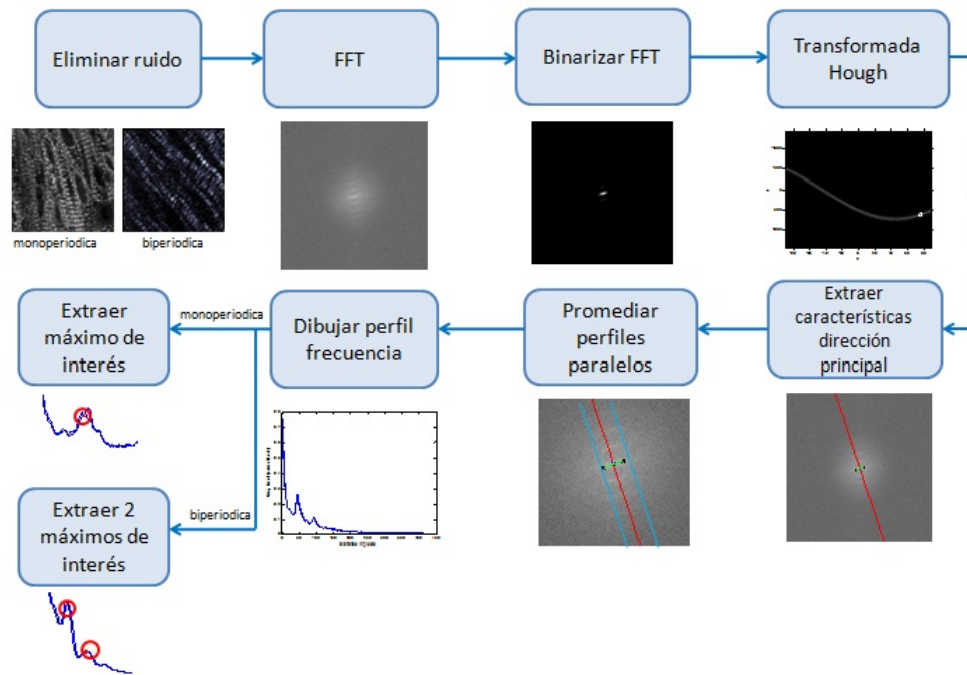


Figura 6.4: Algoritmo para el cálculo de las distancias mediante FFT

### 6.2.3.1. Eliminación de ruido

Las imágenes obtenidas mediante microscopía de fotones están contaminadas principalmente por dos fuentes de ruido: ruido intrínseco (o multiplicativo) y extrínseco (o aditivo). El ruido intrínseco obedece a un modelo de Poisson y se introduce cuando cada fotón choca con el detector, creando así un número aleatorio de fotoelectrones. Otras fuentes extrínsecas introducen ruido aleatorio que puede modelarse como ruido gaussiano aditivo.

Una de las técnicas más utilizadas para eliminar el ruido de las imágenes microscópicas por fotones es la combinación de un filtrado paso bajo y un filtro de Wiener. Primeramente gracias al filtrado paso bajo eliminamos la mayoría del ruido gaussiano. Después el filtro de Wiener intenta reducir el ruido mientras restaura la señal original. Éste implementa equilibradamente un filtrado inverso y suaviza el ruido de manera que se optimice el error cuadrático medio (MSE). Las imágenes tras el filtrado quedan como se muestra en la figura (6.5).

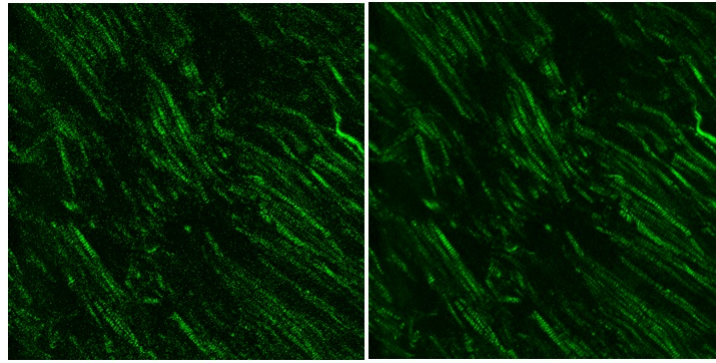


Figura 6.5: Imagen original (izquierda) y imagen filtrada (derecha)

#### **6.2.3.2. Transformada de Fourier**

Tal y como se ha comentado anteriormente, se calcula la transformada discreta de Fourier bidimensional mediante el algoritmo FFT para 2D.

#### **6.2.3.3. Binarización de la transformada de Fourier**

Para poder extraer la información de la línea principal de la transformada de Fourier primeramente necesitamos binarizar la imagen transformada. El problema principal de esta binarización es que el umbral necesario para binarizar correctamente la imagen es dependiente de la imagen y no se puede utilizar uno único para todas las imágenes. Por lo tanto se ha de diseñar un algoritmo capaz de calcular el umbral óptimo para cada una. El algoritmo que se ha diseñado es el siguiente: se calcula el histograma de la imagen en el dominio transformado y se realiza la suma acumulativa. Se busca el valor para el cual la suma es igual al 0,1 % del área de la imagen (para una imagen de 2048x2048 píxeles). Ese valor será el umbral utilizado para binarizar la imagen.

#### **6.2.3.4. Transformada de Hough**

La transformada de Hough es un algoritmo que permite encontrar ciertas formas dentro de una imagen, como líneas, círculos, etc. Emplea una representación paramétrica de formas geométricas. Una recta, por ejemplo se representa por un módulo  $\rho$  (perpendicular a la recta y que pasa por el

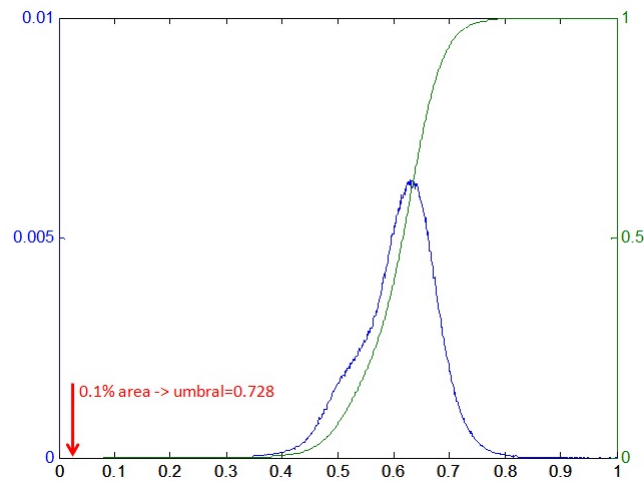


Figura 6.6: Determinación del umbral para la binarización

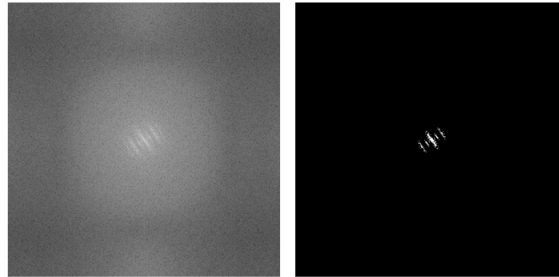


Figura 6.7: Binarización de la imagen FFT

origen (0,0)) y un ángulo  $\varphi$  (formado por el módulo y el eje positivo de las x's). Se representa así:

$$x\cos(\varphi) + y\sin(\varphi) = \rho$$

Por lo tanto una recta tendrá como transformada Hough un punto (ver figura 6.8)

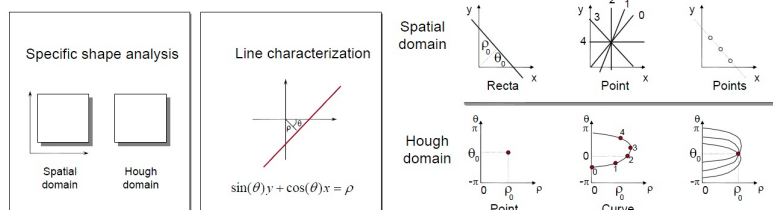


Figura 6.8: Transformada de Hough y ejemplos [19]

De este modo, mediante la transformada Hough podemos extraer los parámetros de la recta de interés tal y como se muestra en la figura 6.9.

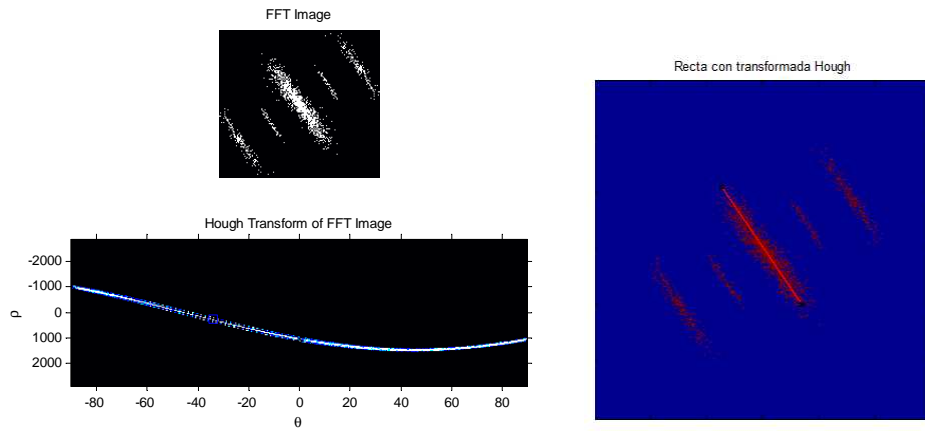


Figura 6.9: Transformada Hough de la FFT

#### 6.2.3.5. Extracción de las características de la dirección principal

Los parámetros de la recta obtenidos mediante la transformada Hough son la pendiente ( $a_1$ ) y la constante ( $b_1$ ). La ecuación de la recta es:  $y_1 = a_1x + b_1$

Siendo  $(c_x, c_y)$  el centro de la imagen, y sabiendo que ambas rectas pasan por ese punto, los parámetros de la recta perpendicular y por lo tanto la que nos determina la dirección de interés son:

$$a_2 = -\frac{1}{a_1}; b_2 = c_y - a_2c_x$$

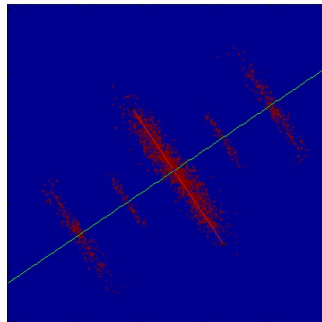


Figura 6.10: Obtención de la recta en la dirección de interés

### 6.2.3.6. Dibujar el perfil de la frecuencia

Una vez obtenida la recta de la dirección principal se realiza un barrido de la imagen siguiendo los puntos determinados por la recta (ver figura 6.11). Los puntos se van calculando en función de la distancia al centro de la imagen como:  $k(d) = \sqrt{(x_d - c_x)^2 + (y_d - c_y)^2} = \sqrt{k_{x_d}^2 + k_{y_d}^2}$ .

La amplitud del perfil se va determinando como  $perfil(d) = p(d) = I(k_x, k_y)$

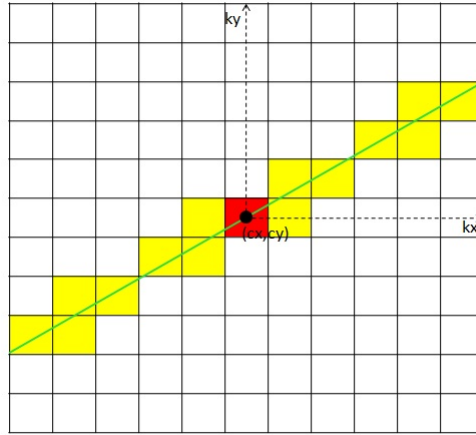


Figura 6.11: Obtención del perfil frecuencial de la imagen

En la figura 6.12 se puede observar cuál sería el perfil frecuencial obtenido, representando en el eje de abscisas  $k(d)$  y en el eje de ordenadas  $p(d)$ .

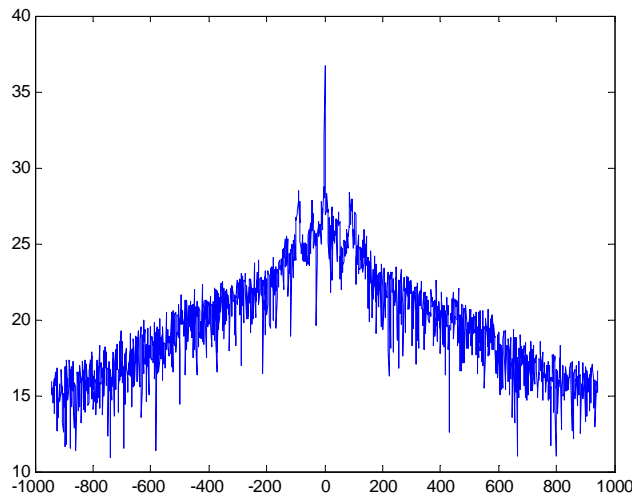


Figura 6.12: Perfil frecuencial



### 6.2.3.7. Promedio de perfiles paralelos

En el perfil frecuencial obtenido de la figura 6.12 se observa como la señal es muy ruidosa y dificulta mucho la extracción de los máximos de interés. Para ello, para minimizar el ruido sin atenuar mucho los máximos se promedian diferentes perfiles paralelos. En la figura 6.13 se puede observar como seria el perfil frecuencial obtenido tras promediarlo con 8 perfiles paralelos (4 a cada lado del perfil principal).

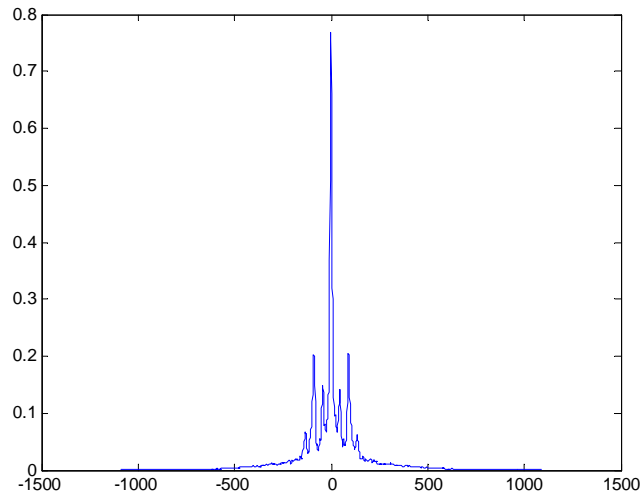


Figura 6.13: Perfil frecuencial promediado

### 6.2.3.8. Extracción máximos de interés

Para hallar los máximos de la señal se calcula la primera derivada y se calculan los pasos por cero de la función derivada. Para discernir entre máximos y mínimos se calcula la segunda derivada y nos quedamos solo con los aquellos puntos que tengan la segunda derivada negativa.

En el caso de la señal monoperiódica se extrae solo el primer máximo. En cambio, para la señal biperiódica se extraen los dos primeros máximos.

Una vez extraídas las frecuencias de interés, las distancias se calculan como:  $d = \sqrt{d_x^2 + d_y^2} = \sqrt{(\frac{1}{Nf_x})^2 + (\frac{1}{Mf_y})^2}$ , donde  $N$  y  $M$  son el tamaño de la imagen en  $x$  y en  $y$  respectivamente. Como las imágenes son cuadradas, finalmente se obtiene que:  $d = \frac{1}{N} \sqrt{\frac{1}{f_x^2} + \frac{1}{f_y^2}} = \frac{1}{Nf}$

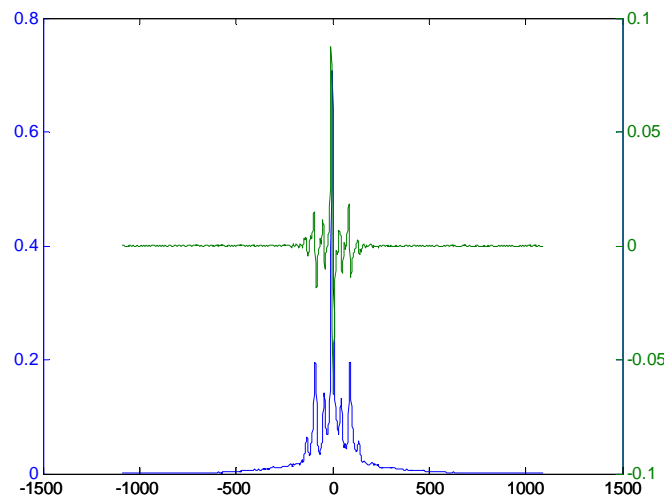


Figura 6.14: Perfil frecuencial (azul) y primera derivada (verde)

#### 6.2.4. Limitaciones

Las principales limitaciones de este enfoque son las siguientes:

- La estimación de la recta principal mediante la transformada hough es una estimación ruidosa.
- El perfil frecuencial en la dirección de interés es muy ruidoso. Para mejorar esta situación, tal y como hemos visto en el apartado 6.2.3, se promedian unas cuantas líneas paralelas para mejorar la SNR. Sin embargo, el ruido de fondo es comparable a la señal medida y esta aproximación no mejora sustancialmente la estimación en todos los casos.
- Estimación sesgada en los patrones biperiódicos: Como ya comentamos en el apartado anterior, la anchura del segundo orden de la longitud del sarcómero (de baja frecuencia espacial) se superpone a la distancia intrasarcomérica. Esto provoca un artefacto en la medida y no podemos medir adecuadamente.

Estas limitaciones son las que motivan a adoptar otro enfoque tecnológico para el cálculo de las distancias: la autocorrelación.

## 6.3. Cálculo de las distancias mediante la autocorrelación

### 6.3.1. Prueba de concepto

La autocorrelación de una señal periódica es también periódica con el mismo período. Por lo tanto el cálculo de la autocorrelación de la imagen nos proporciona también información de las distancias que se desean medir. A continuación, en la figura 6.15 se puede observar cómo son las imágenes de autocorrelación obtenidas para los dos tipos de imágenes con los que trabajamos.

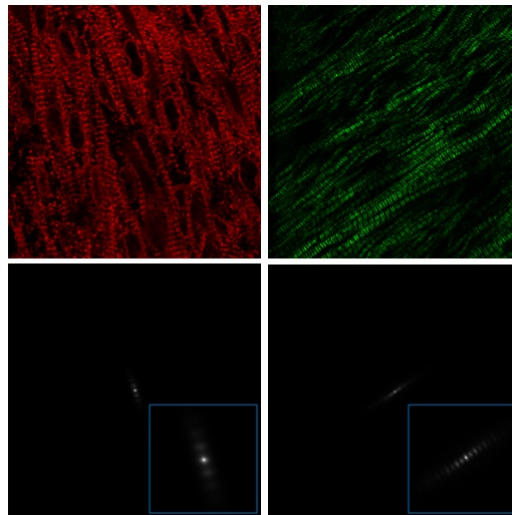


Figura 6.15: Autocorrelación de las imágenes de SERCA (izquierda) y sarcómeros (derecha)

La idea general de extracción de la información de la distancias a partir de la autocorrelación es prácticamente igual que en el caso de Fourier: detectar la orientación principal de las fibras y hacer un barrido de la imagen en esa dirección para obtener el perfil de autocorrelación (ver figura 6.16). Por lo tanto, el algoritmo utilizado es muy parecido al de Fourier.

### 6.3.2. La autocorrelación

La autocorrelación es la correlación cruzada de un señal consigo misma. Es una herramienta matemática para encontrar patrones repetitivos, como la

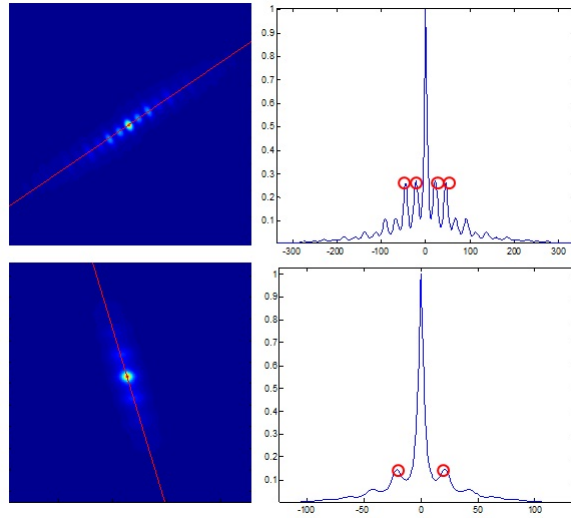


Figura 6.16: Ejemplo detección distancias en sarcómeros (arriba) y SERCA (abajo)

presencia de una señal periódica que ha sido enmascarada por ruido.

En el ámbito de procesado de señal, la autocorrelación se define como:

$$R_{ff}(\tau) = \bar{f}(-\tau) * f(\tau)$$

donde  $\bar{f}$  representa el complejo conjugado y  $*$  representa la convolución.

Si  $f$  se tratase de un proceso aleatorio la autocorrelación debe expresarse en función de sus valores esperados:  $R_{ff}(\tau) = E\{f(t)\bar{f}(t - \tau)\}$

### 6.3.2.1. Propiedades de la autocorrelación

- Simetría: es una de las propiedades fundamentales de la autocorrelación  $R_f(-\tau) = R_f^*(\tau)$
- La función de autocorrelación alcanza un valor máximo en el origen, donde alcanza un valor real:  $|R_f(\tau)| \leq R_f(0)$
- La autocorrelación de una función periódica es también periódica con el mismo período.
- La autocorrelación de una señal de ruido blanco tendrá un fuerte pico en  $\tau = 0$  y valores cercanos a cero y sin ninguna estructura para cualquier otro  $\tau$ . Esto muestra que el ruido blanco carece de periodicidad.

### 6.3.3. Algoritmo para el cálculo de las distancias

En la figura 6.17 se puede ver el diagrama de bloques del algoritmo diseñado.

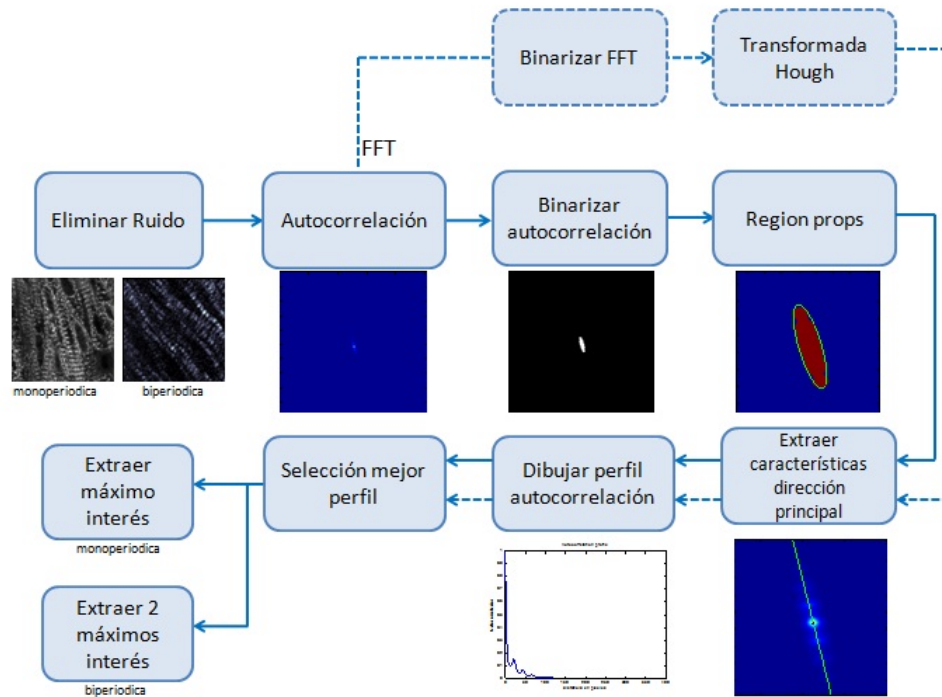


Figura 6.17: Algoritmo para el cálculo de las distancias mediante la autocorrelación

El algoritmo consiste en el calcular la dirección principal mediante dos técnicas diferentes: calculando la transformada Hough de la transformada de Fourier y acotando la región de más energía de la autocorrelación por una elipse. La decisión sobre qué dirección es la más correcta se realiza en función de cuál de los dos perfiles obtenidos tras el barrido tiene más energía. Finalmente se extraen los máximos del perfil seleccionado. En este caso no es necesario realizar ningún promedio con perfiles paralelos ya que la señal obtenida es una señal mucho más limpia gracias a que el ruido, en el caso de ruido blanco gaussiano, tiene como autocorrelación una delta en el origen.

Como se puede observar muchos de los bloques utilizados son los mismos que en el caso de la transformada de Fourier (ver 6.4) . Por lo tanto sólo comentaremos aquellos bloques que son diferentes respecto al algoritmo de Fourier.

### 6.3.3.1. Cálculo de la autocorrelación

Las imágenes que utilizamos son imágenes muy grandes, de 1024x1024 píxeles las más pequeñas, por lo tanto calcular la autocorrelación de las imágenes mediante la convolución es una forma muy costosa computacionalmente hablando. Para solventar esto haremos uso de la propiedad de la transformada de Fourier por la cual, una convolución espacial se transforma en un producto de transformadas frecuencial. De esta manera se puede calcular la autocorrelación de una imagen como:

Siendo  $I = \mathcal{F}\{imagen\}$  y  $R(\tau)$  la autocorrelación de la imagen

$$R(\tau) = \mathcal{F}^{-1}(|I \cdot I|)$$

El coste computacional del cálculo de la FFT en dos dimensiones es muy inferior al de la convolución en dos dimensiones. Así pues, se obtiene la autocorrelación mucho más rápidamente.

### 6.3.3.2. Region props de MATLAB

La mayor parte de la energía de las funciones de autocorrelación de imágenes naturales se concentra en una región que tiene una forma elipsoidal debido a la morfología de nuestras imágenes. Esta característica nos resulta muy útil para poder detectar la dirección principal ya que se puede acotar esta región por una elipse y calcular sus dos ejes (mayor y menor) y el ángulo del eje mayor respecto al eje de abscisas. MATLAB tiene una función denominada *regionprops* que precisamente calcula estos parámetros de la elipse. Por lo tanto la dirección principal vendrá determinada por el ángulo de la elipse.

### 6.3.3.3. Extracción de las características de la dirección principal

En el caso del cálculo mediante *regionprops* la dirección calculada es directamente la dirección de interés.

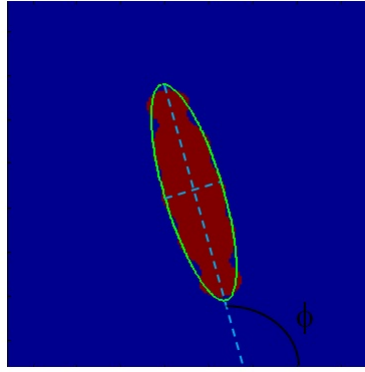


Figura 6.18: Cálculo de la dirección mediante regionprops de MATLAB

#### 6.3.3.4. Selección del mejor perfil

Aprovechando que se calcula la transformada de Fourier para calcular la autocorrelación se realiza la transformada Hough de la misma forma que se realizó en el algoritmo de Fourier (ver apartado 6.2.3), y se calcula la dirección principal. Una vez calculada, se dibuja el perfil de la autocorrelación siguiendo esta dirección. A la vez se calcula también la dirección mediante regionprops y se dibuja el correspondiente perfil. Para decidir cual de los dos perfiles obtenidos es el más correcto se calcula la energía de cada perfil como:  $E = \sum_{n=-\infty}^{n=\infty} |x(n)|^2$  y el perfil seleccionado será el que tenga mayor energía.

### 6.4. Comparación de los dos enfoques: Fourier y autocorrelación

A parte de las limitaciones ya comentadas de la herramienta basada en la transformada de Fourier se observa que mediante la herramienta basada en la autocorrelación podemos medir adecuadamente con un nivel de SNR inferior y con menos contraste en la imagen. Este hecho se acentúa aun más en el caso biperiódico. En la figura 6.19 podemos observar en color azul las imágenes que hemos podido medir y en rojo las que no, con los dos algoritmos. En ambos casos (monoperiódico y biperiódico) somos capaces de medir muchas más imágenes con el algoritmo de autocorrelación que con el de FFT.

Las imágenes que no se han podido medir con ninguno de los dos algoritmos

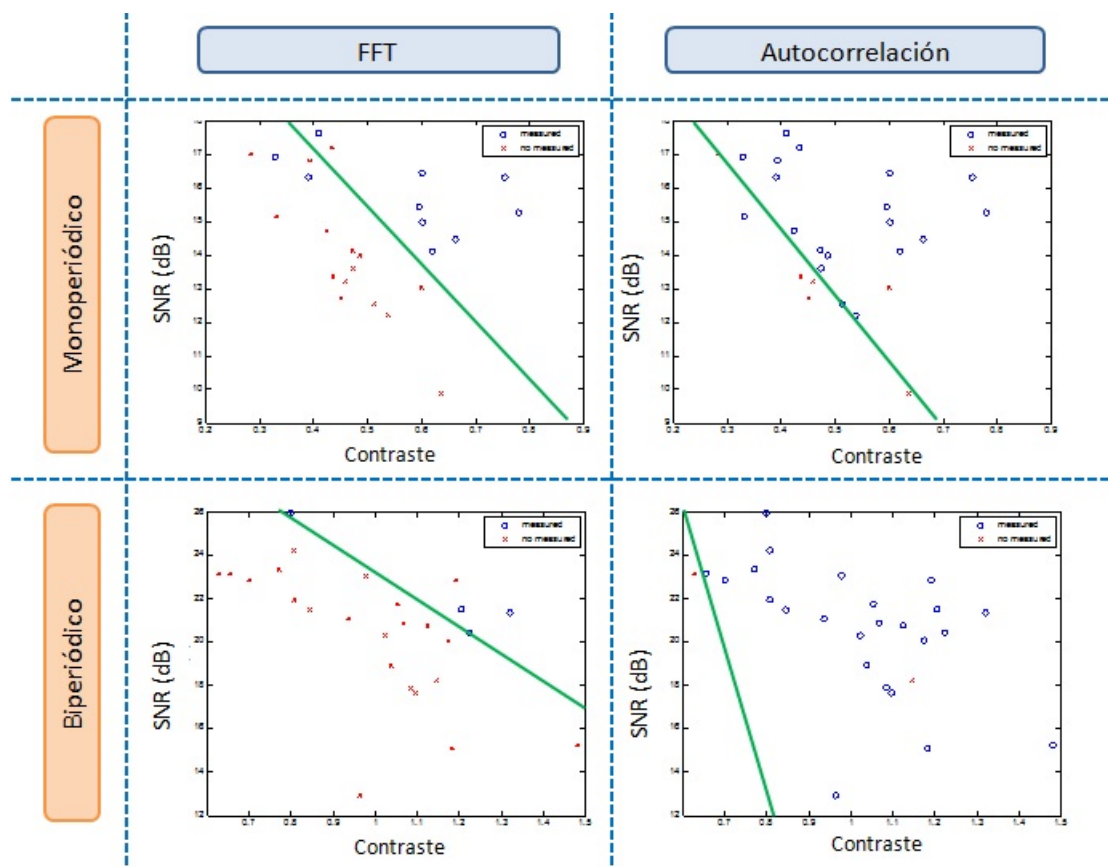


Figura 6.19: Requerimientos de SNR y contraste

son imágenes en las cuales el patrón periódico de las fibras está muy difuso debido a la mala calidad de las imágenes.

Para acabar de determinar cual de los dos enfoques es el que obtiene un mejor comportamiento se van a comparar las distancias medidas manualmente con las obtenidas mediante las dos técnicas, tanto en el caso monoperiódico como en el caso biperiódico. La validación de las técnicas se explica en el siguiente apartado.

## 6.5. Validación del cálculo de las distancias

### 6.5.1. Distancia de localizaciones de SERCA

Para comprobar el buen funcionamiento de los dos algoritmos comparamos las distancias calculadas manualmente en 10 imágenes con las obtenidas



por los dos algoritmos. Para poder cuantificarlo de alguna manera se calculan 4 parámetros: sesgo, sesgo relativo, varianza y varianza relativa. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Primeramente en la tabla 6.1 se observa la media y varianza obtenida en las medidas realizadas con los dos algoritmos y en las medidas realizadas manualmente.

	Manual (m)	FFT (m)	Autocorrelación (m)
<b>Media</b>	1,71E-06	1,74E-06	1,70E-06
<b>Varianza</b>	7,19E-08	5,42E-08	2,49E-08

Tabla 6.1: Media y varianza de las medidas de la distancian en el caso monoperiódico

Un forma más intuitiva de representar estos resultados es mediante las gráficas *boxplot*. Éstas representan los resultados como se explica en la figura 6.20. De esta manera, el *boxplot* de los resultados de las medidas se muestra en la figura 6.21.

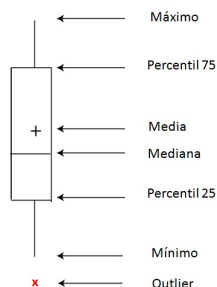


Figura 6.20: Representación *boxplot*

En estos primeros resultados observamos que con ambos algoritmos obtenemos menos variabilidad en las medidas que si se hacen manualmente. Este resultado tiene mucho sentido ya que las medidas realizadas manualmente están sujetas a la variabilidad propia de la persona que realiza las medidas.

En la tabla 6.2 se representan los valores de sesgo y varianza obtenidos con los dos algoritmos.

Aunque con ambas técnicas utilizadas obtenemos muy buenos resultados, si se comparan ambas se observa que se obtienen mejores resultados con el

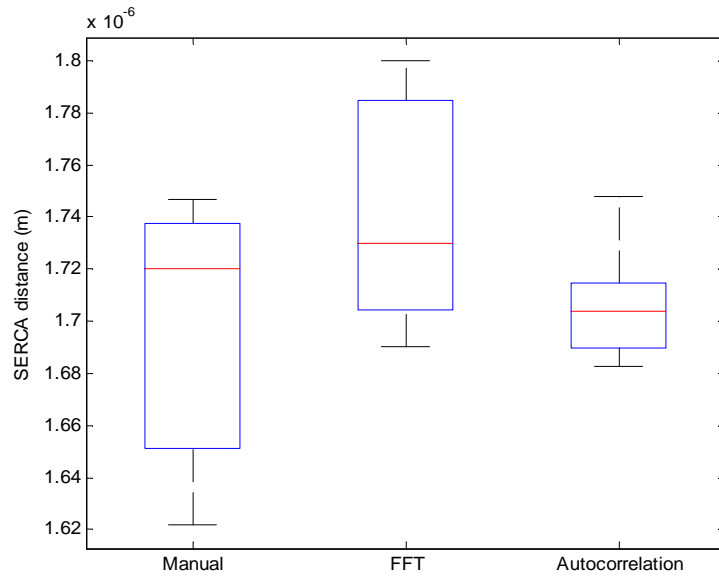


Figura 6.21: Boxplot de las medidas

algoritmo que utiliza la autocorrelación en vez de Fourier, ya que las medidas tienen menos sesgo (se parecen más a las medidas manuales) y además tienen menor variabilidad. Este echo es debido, entre otras cosas, a que como ya se ha visto en este capítulo, la señal del perfil frecuencial está contaminada por ruido, el cual introduce un error en la determinación de la posición del máximo.

### 6.5.2. Distancias del sarcómero

De la misma forma que en el apartado anterior se han realizado las medidas de las distancias en 10 imágenes diferentes manualmente y mediante los dos algoritmos diseñados. En este caso se calcula también la ratio entre las dos distancias como:  $ratio = \frac{distancia2}{distancia1}$ , siendo la distancia 1 la distancia intrasarcomérica y la distancia 2 la distancia intersarcomérica. Esta ratio nos servirá como otro parámetro de calidad de las medidas para comparar los tres métodos (manual, fft y autocorrelación).

De la misma forma que en el caso anterior, las medias y varianzas de las medidas de las distancias obtenidas tras la medida manual y las medidas mediante los dos algoritmos se muestran en la tabla 6.3.

Medidas	FFT	Autocorrelación
sesgo: $\delta =  \mu_{\text{manual}} - \mu_{\text{algoritmo}} $	2,37E-08 m	1,28E-08 m
sesgo relativo: $\delta/\mu_{\text{manual}}$	0,014	0,007
varianza $\sigma$	5,42E-08 m	2,50E-08 m
varianza relativa $\sigma/\mu_{\text{manual}}$	0,032	0,015

Tabla 6.2: Parámetros de calidad de las medidas

	Distancia 1 (m)			Distancia 2 (m)		
	Manual	FFT	Autocorrelación	Manual	FFT	Autocorrelación
<b>Media</b>	8,00E-07	8,68E-07	8,07E-07	1,73E-06	1,79E-06	1,72E-06
<b>Varianza</b>	2,51E-08	1,29E-08	2,23E-08	3,43E-08	1,88E-07	2,86E-08

Tabla 6.3: Medias y varianzas de las medidas de las distancias en el caso biperiódico

Al igual que en el caso anterior representamos estos resultados en una gráfica *boxplot* (figura 6.22).

En la tabla 6.4 se representan los valores de sesgo y varianza obtenidos con los dos algoritmos para las dos distancias.

	Distancia 1		Distancia 2	
Medidas	FFT	Autocorrelación	FFT	Autocorrelación
sesgo: $\delta =  \mu_{\text{manual}} - \mu_{\text{algoritmo}} $	6,79E-08 m	6,78E-09 m	5,31E-08 m	1,04E-08 m
sesgo relativo: $\delta/\mu_{\text{manual}}$	0,085	0,008	0,031	0,006
varianza $\sigma$	1,29E-08 m	2,82E-08 m	1,88E-07 m	2,86E-08 m
varianza relativa $\sigma/\mu_{\text{manual}}$	0,016	0,028	0,108	0,017

Tabla 6.4: Parámetros de calidad de las medidas de la distancias en el caso biperiódico

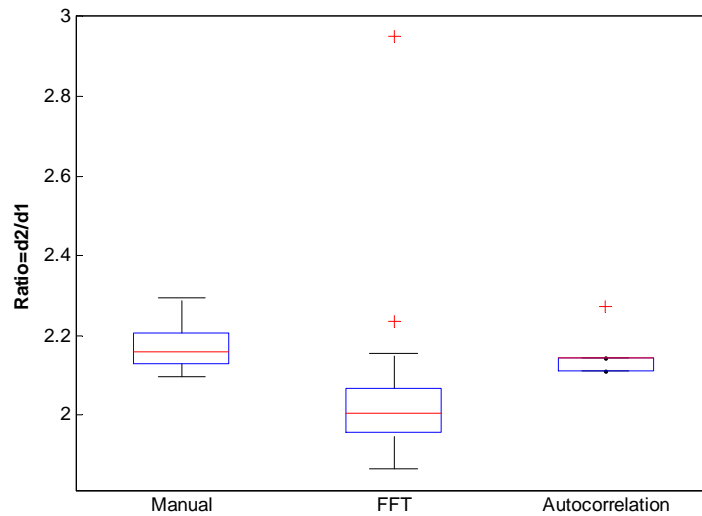


Figura 6.22: Boxplot del ratio entre distancias

Si se observa la figura 6.22 se aprecia que la ratio entre las distancias en el caso manual es de 2.17, en el caso de la FFT de 2.00 y en el caso de la autocorrelación es de 2.14. Por lo tanto el algoritmo mediante FFT no calcula bien las distancias. Esto es así debido a un problema de aliasing: el segundo armónico de la frecuencia más baja (correspondiente a la distancia larga, o distancia 2) está muy cerca de la frecuencia más alta (correspondiente a la distancia corta, o distancia 1), y por lo tanto enmascara la componente frecuencial que queremos medir. Por eso, que obtengamos un ratio entre distancias siempre de 2.00 nos está indicando que estamos calculando el segundo armónico de la primera frecuencia en vez de la componente frecuencial deseada.

### 6.5.3. Conclusiones

Observando pues todos los resultados obtenidos, podemos concluir que el algoritmo de cálculo de las distancias mediante la autocorrelación se comporta mucho mejor tanto en el caso monoperiódico, como en el biperiódico, donde en este último se acentúa aún más este hecho, ya que con la transformada de Fourier obtenemos una estimación sesgada de las distancias.

## 6.6. GUI para el cálculo de las distancias

Se ha diseñado una GUI (Grafical User Interface) en MATLAB que nos permite seleccionar una área cuadrada de la imagen, para así poder seleccionar una zona donde el contexto local sea más o menos homogéneo, y calcular las distancias de manera automática. Los datos de la medida se guardan y se exportan a una hoja excel. En la figura (6.23) se muestra una captura de la GUI.

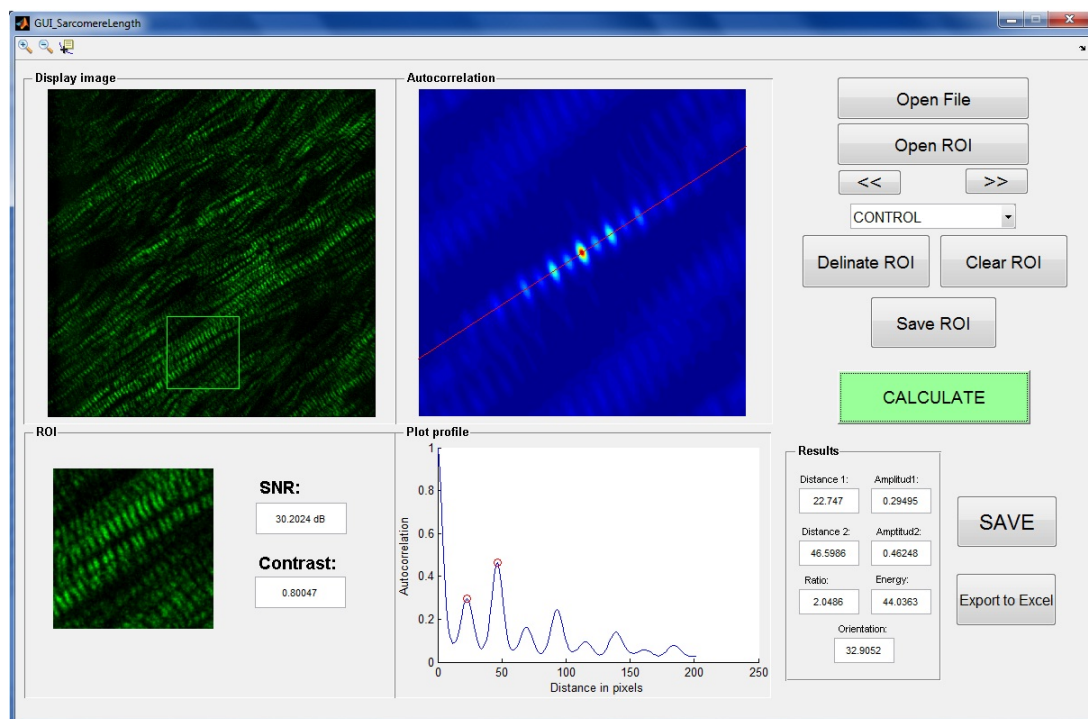


Figura 6.23: GUI para el cálculo de las distancias

## 6.7. Conclusiones

El diseño de la herramienta de las distancias en estructuras fibrilares se ha realizado satisfactoriamente. Las medidas realizadas con la herramienta coinciden con las medidas manuales y además se obtiene una varianza mucho menor. De los dos enfoques realizados el que tiene un mejor comportamiento es el basado en la autocorrelación ya que las medidas tienen menos sesgo y varianza. Todo y con eso, el algoritmo diseñado no es del todo automático ya que se debe seleccionar manualmente una zona homogénea de la imagen.

Con la herramienta de seguimiento de fibras que se explica en el capítulo siguiente se pretende automatizar este proceso ya que se podrá realizar un seguimiento de la fibra y realizar una medida local de las distancias.

# Capítulo 7

## Herramienta 2: Seguimiento de fibras

### 7.1. Motivación

**L**AS imágenes de tejido cardíaco con las que trabajamos (imágenes de SERCA y sarcómeros) están formadas por distintas fibras. Cada una de estas fibras sigue una orientación diferente e incluso puede presentar distancias promedio diferentes (ver figura 7.1). Mediante la herramienta para la medida de las distancias diseñada (capítulo 6) no estamos teniendo en cuenta la variación local de orientación de las diferentes fibras, ya que el cálculo de las distancias se realiza en la dirección principal de la imagen. Es decir, se realiza una medida global en vez de una medida local que sería la forma más correcta de realizar el cálculo de las distancias.

Una manera de intentar calcular correctamente las distancias es seleccionar manualmente una zona de la imagen donde las fibras describan una trayectoria lo más recta posible, tal y como se ha hecho con la GUI diseñada (ver apartado 6.6). Los inconvenientes de esta solución es que, primero, se requiere una delineación manual para seleccionar la zona de interés y por lo tanto es necesario más tiempo para realizar los cálculos. El otro inconveniente es que al seleccionar sólo una zona de la imagen estamos perdiendo mucha información.

En este capítulo se explica el desarrollo de la herramienta que estudiará el contexto local de la imagen para así realizar el seguimiento de las diferentes

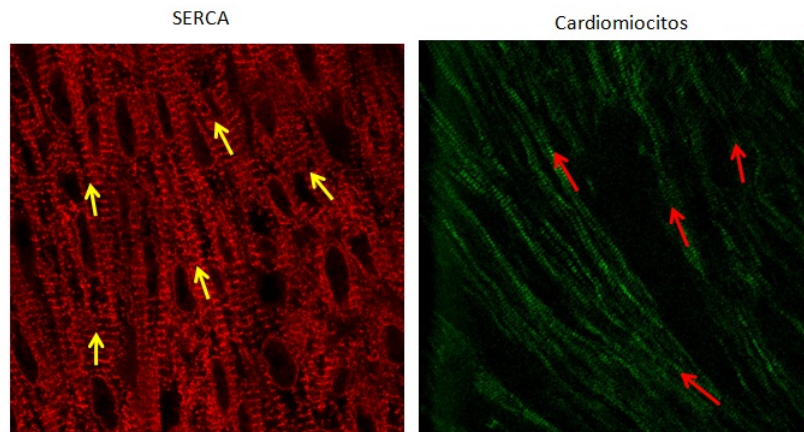


Figura 7.1: Diferentes orientaciones de las fibras en una imagen de SERCA (izquierda) y sarcómeros (derecha)

fibras que componen una imagen de tejido cardíaco. Esta herramienta permitirá combatir los inconvenientes mencionados y se obtendrá una medida lo más correcta posible, es decir, se calcularán las distancias promedio localmente obteniendo así menos error en la medida.

## 7.2. Cálculo de la orientación local de las fibras

Lo primero que se necesita calcular es la orientación que van tomando las fibras localmente. El algoritmo diseñado para el cálculo de la dirección principal local sigue la idea del cálculo de los tensores de difusión en resonancias magnéticas[22], conocido como DTI<sup>1</sup>. En DTI se aplica un campo magnético a la muestra en, por lo menos, seis direcciones diferentes, lo que permite calcular un tensor (elipsoide) por cada voxel, que muestra tridimensionalmente la forma del patrón de difusión del agua. Este patrón tiene la forma de un elipsoide.

Como ya hemos visto en el capítulo 6, la autocorrelación de las fibras tienen una forma elipsoidal por lo tanto, el tensor calculado en nuestro caso, es la imagen de autocorrelación binarizada y la dirección de difusión máxima del agua se corresponderá con la dirección principal de la fibra. Puesto que las

<sup>1</sup>Del inglés: Diffusion Tensor Imaging



imágenes que utilizamos son en dos dimensiones, en cada punto de la imagen tendremos un vector de dos componentes que indicarán la dirección principal de la fibra en ese punto.

Una vez se tiene el tensor, deben procesarse sus valores para obtener las direcciones principales para cada uno de los píxeles. Este proceso se realiza mediante la diagonalización del tensor. Tras la diagonalización se obtiene un sistema equivalente formado por 2 vectores unitarios y ortogonales que definen las direcciones principales de difusión de los datos  $(\vec{v}_1, \vec{v}_2)$ , denominados vectores propios, y una matriz diagonal con las longitudes (o módulos) correspondientes a cada uno de los vectores anteriores  $(\lambda_1, \lambda_2)$ , también denominados valores propios, donde  $\lambda_1 > \lambda_2$ .

$$D = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} \\ D_{yx} & D_{yy} \end{pmatrix} = (\vec{v}_1, \vec{v}_2) \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \end{pmatrix} (\vec{v}_1, \vec{v}_2)^T$$

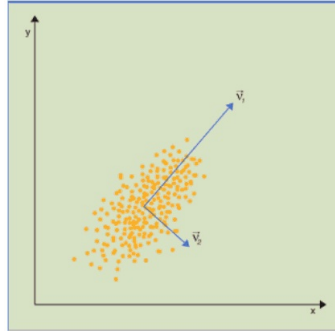


Figura 7.2: Vectores propios según las direcciones de máxima dispersión de los datos [25]

Mediante los datos obtenidos en la diagonalización del tensor se pueden calcular diversas variables a partir de las cuales se pueden crear mapas paramétricos de difusión. Una de las variables más usadas es la que se conoce como factor de anisotropía fraccional (FA), y se calcula como:

$$FA = \frac{\sqrt{(\lambda_1 - \hat{\lambda})^2 + (\lambda_2 - \hat{\lambda})^2}}{\sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2}}$$

$$\hat{\lambda} = \frac{\lambda_1 + \lambda_2}{2}$$

El valor de la anisotropía fraccional es un valor escalar comprendido entre 0 y 1 que describe el grado de anisotropía del proceso de difusión. Un valor de

0 significa que la difusión es isotrópica (no hay una dirección predominante), y un valor de 1 significa que la difusión solo ocurre en una dirección.

El vector propio de mayor valor propio ( $\vec{v}_1$ ) es el que indica la dirección de mayor difusión.

### **7.2.1. Algoritmo para el cálculo de la orientación local de las fibras**

El algoritmo general implementado funciona de la siguiente manera:

1. Selección de un bloque de 128x128 pixels.
2. Cálculo de la imagen de autocorrelación del bloque.
3. Binarización y segmentación de la imagen de la autocorrelación.
4. Cálculo de la matriz de covarianza con los puntos de la autocorrelación segmentada.
5. Diagonalización de la matriz de covarianza y cálculo de los dos vectores propios y valores propios.
6. Cálculo del factor de anisotropía fraccional.
7. Cálculo de la dirección principal como el vector propio que tiene un valor propio mayor en módulo.
8. Desplazamiento de 16 pixels y selección del siguiente bloque.

El tamaño del bloque y del desplazamiento ha sido seleccionado en función del coste computacional y de los errores cometidos al estimar la orientación . Se ha determinado que para una imagen de 1024x1024 el tamaño de bloque idóneo es de 128x128 pixels y con un desplazamiento de 16 pixels. De esta manera, el tamaño de la imagen de la orientación es de 64x64. En la figura 7.4 se observan dos ejemplos del cálculo de la orientación local. La primera imagen se corresponde a una imagen monoperiódica de localizaciones de SERCA y la segunda a una imagen biperiódica de sarcómeros. Los colores indican la dirección local que sigue la fibra en ese punto entre 0º y 180º.

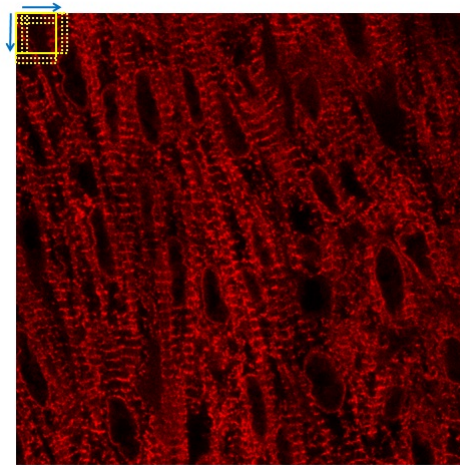


Figura 7.3: Selección de los bloques para el cálculo de la orientación local

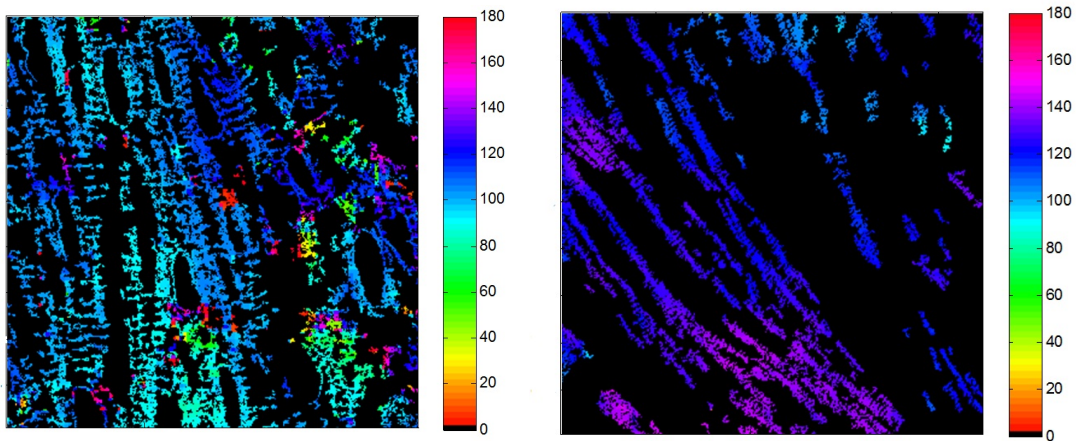


Figura 7.4: Imagen de orientación local de SERCA (izquierda) y sarcómeros (derecha)

Para eliminar los valores erróneos de orientación calculados, filtramos la imagen descartando todos los puntos que tengan un factor de anisotropía fraccional menor a 0.5 (escogido tras probar diferentes valores) (7.5).

### 7.3. Seguimiento de las fibras

Una vez calculados todos los tensores y sus correspondientes vectores propios es necesario identificar, seguir y reconstruir las fibras. Para ello se realiza un proceso iterativo basado en las direcciones principales obtenidas mediante los vectores propios, empleando como condición de propagación los valores

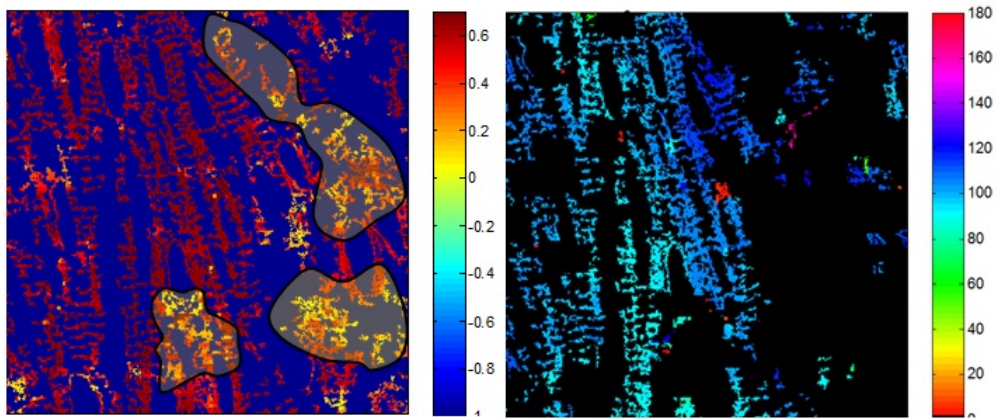


Figura 7.5: Eliminación de los valores de orientación erróneos

de anisotropía. En la figura 7.8 se puede ver un ejemplo de como sería la reconstrucción de las fibras.

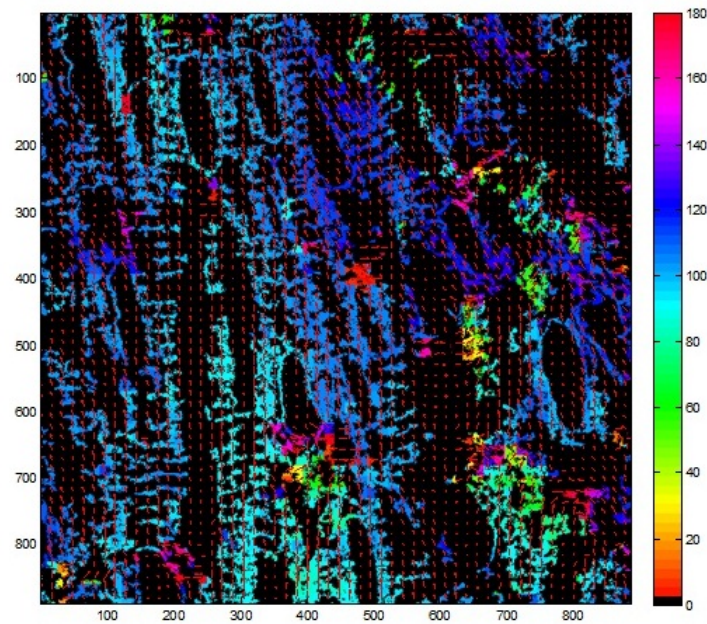


Figura 7.6: Mapa de direcciones locales en imagen de SERCA

### 7.3.1. Propagación de las líneas

El proceso de propagación de las líneas comienza con la definición de un origen, también conocido como semilla (puntos 1 y 2 en la figura 7.8). Una de las aproximaciones al proceso de reconstrucción consiste en tomar la



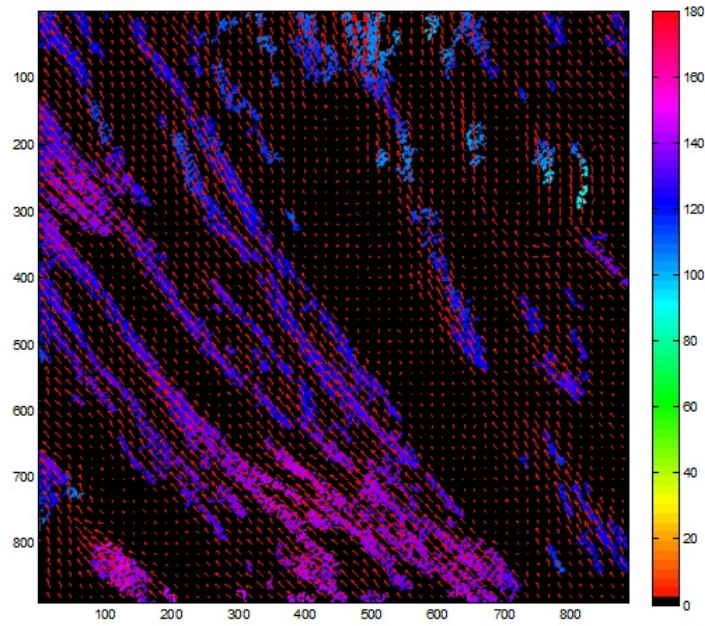


Figura 7.7: Mapa de direcciones locales en imagen de sarcómeros

orientación del pixel que actúa como semilla inicial, realizando un primer trazado desde su centro hasta encontrar el límite con uno de sus vecinos (nueva semilla). A partir de aquí el proceso continua de forma iterativa, añadiendo a cada paso un nuevo segmento que tendrá como origen el punto de contacto con la semilla anterior, y será trazado en función de la orientación de la semilla, hasta alcanzar el límite con uno de sus vecinos. De esta forma, el proceso continuará mientras se mantenga el nivel de anisotropía (en nuestro caso mayor a 0.5) y el desfase angular ( $\alpha$ ) entre la semilla y el candidato no supere cierto umbral ( $\alpha < 45^\circ$ ).

### 7.3.2. Interpolación de los puntos

El proceso de propagación de líneas, parte de una semilla inicial y sucesivamente encuentra puntos que constituyen una trayectoria. Los tensores estimados, sin embargo, sólo están presentes en el centro de los píxeles. Aunque partamos del centro de un píxel no podemos prever donde estará localizado el siguiente punto. Esta situación se puede observar en la figura 7.9.

Por ese motivo se requiere un mecanismo de interpolación que estime el valor del tensor de difusión en un punto arbitrario. La interpolación de

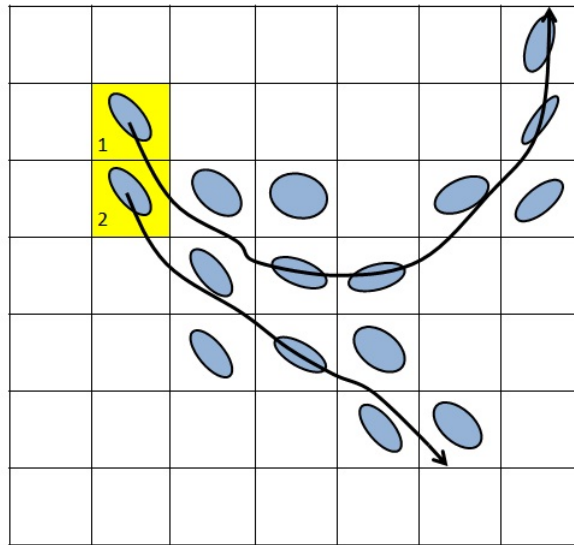


Figura 7.8: Ejemplo de propagación de líneas a partir de las direcciones de máxima difusión, representadas por elipses

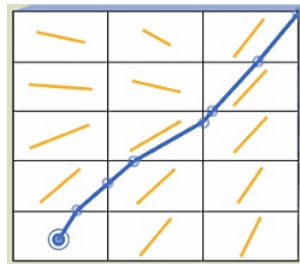


Figura 7.9: Obtención de los puntos de la trayectoria

tensores se beneficia del hecho de que sus elementos pueden ser interpolados directamente. En otras palabras, encontrar el valor interpolado de un tensor se resume en interpolar cada una de sus componentes escalares independientes. La interpolación utilizada es la interpolación bilineal, una de las más simples y conocidas.

### 7.3.3. Elección de las semillas

Para poder reconstruir las fibras es necesario un conjunto de semillas que serán el origen de estas. La mayoría de algoritmos de reconstrucción de fibras suele utilizar como semillas los puntos que tienen un mayor factor de anisotropía fraccional. En nuestro caso, como los valores de anisotropía fraccional son bastante elevados en toda la imagen, siendo así difícil la

elección adecuada de semillas, utilizaremos los valores de la imagen que tengan una mayor energía.

#### 7.3.4. Algoritmo para la reconstrucción de fibras

El algoritmo que se ha diseñado para la reconstrucción de las fibras es el que se muestra a continuación:

```
Para todas las semillas seleccionadas{  
    Mientras valor anisotropía > 0.6 y desfase angular < 45° {  
        Calcula siguiente punto trayectoria  
    }  
    Guarda nueva fibra  
}
```

Puesto que las direcciones sólo están comprendidas entre 0° y 180° la reconstrucción de las fibras sólo se hará en un sentido. Es por eso que ejecutaremos también el algoritmo de reconstrucción en el sentido contrario (180° - 360°) a partir de las mismas semillas, intentado así combatir la ambigüedad del sentido de la fibra existente.

### 7.4. Resultados de la reconstrucción de las fibras

En las figuras 7.10 y 7.11 se observan los resultados de la reconstrucción de las fibras en las imágenes de sarcómeros y en las imágenes de SERCA respectivamente.

Tal y como se observa obtenemos mejores resultados con las imágenes de sarcómeros que con las imágenes de SERCA. Esto es debido a que al calcular la orientación local cometemos más errores en el caso de las imágenes de SERCA. Este error en el cálculo es debido, principalmente, a que la señal de fluorescencia de SERCA es menos específica que la señal de SHG de los

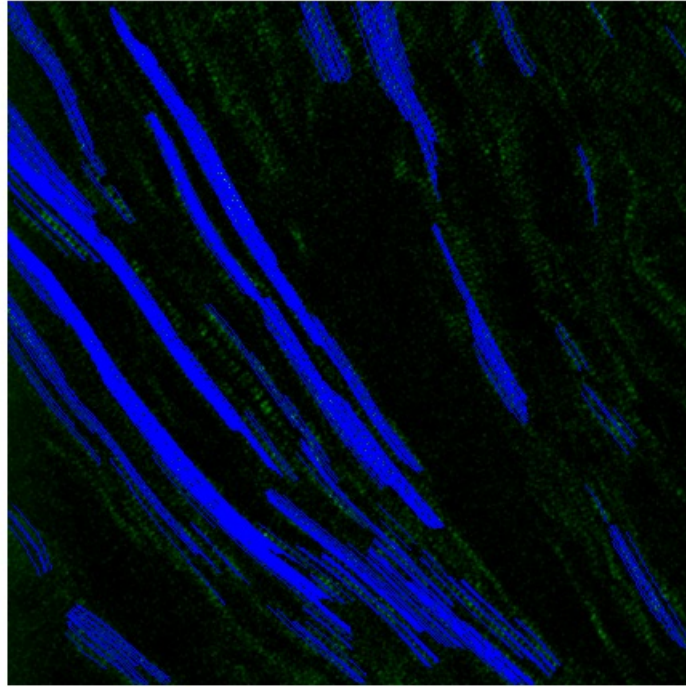


Figura 7.10: Resultado de la reconstrucción de las fibras de sarcómeros

sarcómeros. Además, al captar las imágenes de SERCA también estamos captando la señal de autofluorescencia del propio tejido y esto nos introduce ruido en la imagen.

## 7.5. Limitaciones

La mayor limitación de esta herramienta es la ambigüedad angular que tenemos al calcular las orientaciones locales, ya que estas están comprendidas solamente entre  $0^\circ$  y  $180^\circ$ . Por eso, como hemos visto, a la hora de hacer el seguimiento de las fibras lo hacemos primero tomando el sentido positivo (direcciones entre  $0^\circ$  y  $180^\circ$ ) y después tomando el sentido negativo (direcciones entre  $180^\circ$  y  $360^\circ$ ).

La otra limitación es que al hacer el cálculo de la orientación local no lo hacemos píxel a píxel, que sería lo ideal, sino que interpolamos el valor obtenido a una región de  $16 \times 16$  píxeles. La interpolación se realiza con el fin de reducir el tiempo de ejecución del algoritmo. Con los valores escogidos se reduce el tiempo de ejecución un factor  $\frac{1024^2}{(\frac{1024}{16})^2} = 16^2$ . Esta interpolación



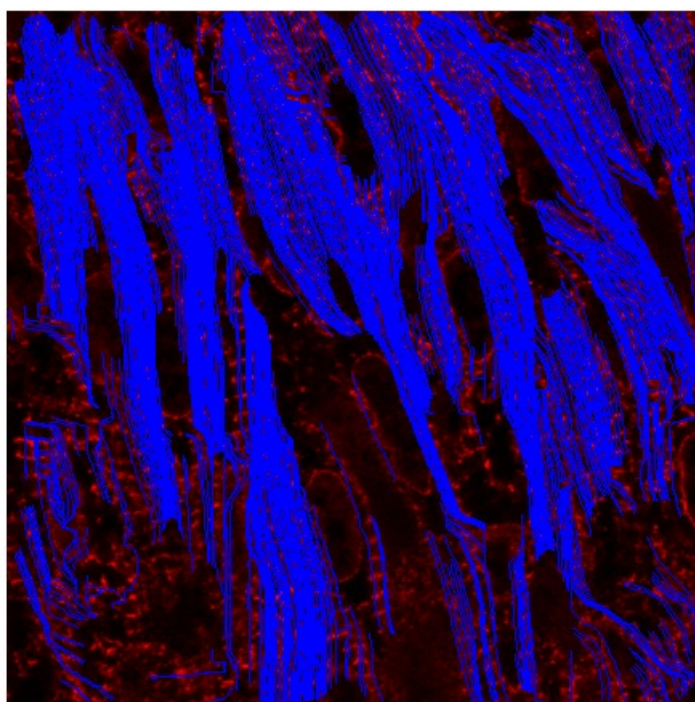


Figura 7.11: Resultado de la reconstrucción de las fibras de SERCA

no es grave ya que un sarcómero mide aproximadamente unos 20x20 pixels (para una resolución de 80 nm/px) y localmente un sarcómero no variará su orientación, por lo tanto podemos suponer que la orientación en una región de 16x16 píxeles es constante.

## 7.6. Conclusiones

El desarrollo de la herramienta para el seguimiento de fibras se ha realizado satisfactoriamente. Somos capaces de seguir todas las fibras que componen la imagen, con lo cual podremos realizar una medida fibra a fibra de las distancias promedio. Gracias a esto, la medida de las distancias se podrá realizar de forma totalmente automática y cometiendo el menor error posible.



# Capítulo 8

## Herramienta 3: Modelo paramétrico

### 8.1. Motivación

EN el capítulo 5 vimos que una de las limitaciones de la herramienta para medir distancias, en el caso biperiódico, es la existencia de una interferencia en la medida de la distancia intrasarcómerica o distancia entre sub-bandas A. Esta interferencia viene causada por el segundo pico de la distancia intersarcómerica o longitud del sarcómero y provoca una variabilidad del 10 % en la medida de la distancia intrasarcómerica. Por eso, para estudiar este efecto y poder corregirlo posteriormente, se ha realizado un modelo paramétrico de la autocorrelación del sarcómero.

En este capítulo se desarrolla el modelo paramétrico de la autocorrelación del sarcómero, primero partiendo del caso más genérico posible y después adoptado dos aproximaciones posibles que simplifiquen el modelo. Se determinará qué nivel de aproximación se puede aplicar evaluando el error cometido en cada aproximación y el nivel de simplificación que conseguimos.

#### 8.1.1. Definición de un sarcómero

En un estudio realizado por *Thierry Boulesteix* [7] se demuestra que la señal de SHG a lo largo de un sarcómero se puede aproximar por dos gaussianas

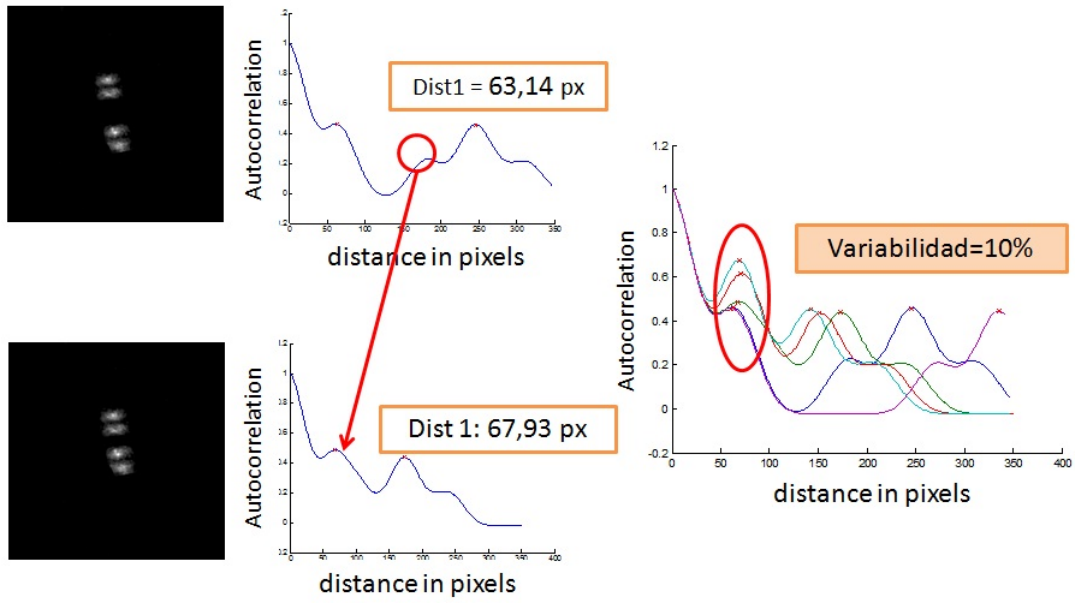


Figura 8.1: Efecto de la interferencia en la distancia intrasarcomérica

(ver figura 8.2). El modelo paramétrico que se va a diseñar parte de esta premisa.

De esta forma la señal de un sarcómero se define como la suma de dos guassianas. Estas gaussianas están separadas entre sí una distancia  $T_1$ , que se corresponde con la distancia intrasarcomérica, o distancia entre sub-bandas A (ver capítulo 5). La manera más genérica de definirlo es suponiendo que ambas gaussianas son de amplitud y anchuras diferentes. De esta forma, el modelo de un sarcómero queda expresado como se muestra en la ecuación 8.1,

$$s(x) = \alpha_- e^{-\frac{(x-\frac{T_1}{2})^2}{2\sigma_-^2}} + \alpha_+ e^{-\frac{(x+\frac{T_1}{2})^2}{2\sigma_+^2}} = \alpha_- g_-(x - \frac{T_1}{2}) + \alpha_+ g_+(x + \frac{T_1}{2}) \quad (8.1)$$

$$g_i = e^{-\frac{x^2}{2\sigma_i^2}} = N(0, \sigma_i^2) \quad (8.2)$$

siendo  $\alpha_-$ ,  $\alpha_+$  las amplitudes de cada sub-banda A, que vendrán determinadas por las condiciones de iluminación durante la adquisición de la imagen y sus valores estarán comprendidos entre  $0 \leq \alpha_-, \alpha_+ \leq 1$ .

A la hora de definir el modelo paramétrico de la autocorrelación de una fibra de sarcómeros hemos adoptado tres niveles de aproximación diferentes. El primer nivel se corresponde al caso más genérico posible, en el cual las dos

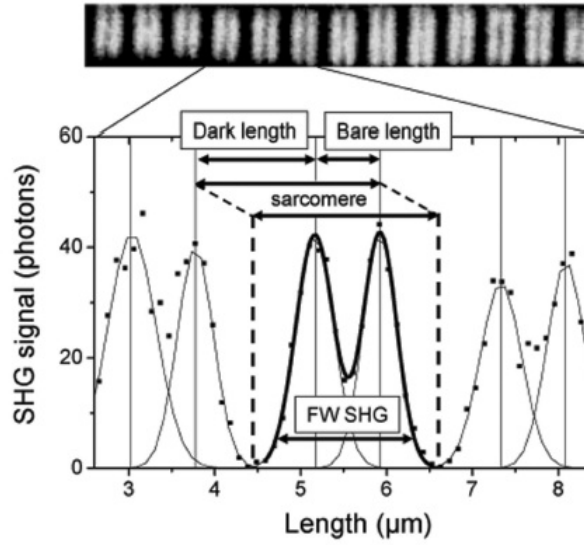


Figura 8.2: Señal de SHG a lo largo de un sarcómero según *Thierry Boulesteix* [7]

gaussianas que componen la señal del sarcómero se consideran totalmente independientes en amplitud y anchura ( $\alpha_i, \sigma_i^2$ ) (modelo genérico). El segundo nivel de aproximación es suponer que las dos gaussianas son de la misma anchura pero de amplitudes independientes ( $\alpha_i, \sigma^2$ ) (modelo condicionado). Por último, el tercer caso es suponer que el sarcómero es una estructura completamente simétrica y por lo tanto las dos gaussianas son idénticas ( $\alpha, \sigma^2$ ) (modelo simétrico).

## 8.2. Modelo genérico: sarcómeros con amplitudes y anchuras diferentes

### 8.2.1. Autocorrelación de un sarcómero.

Lo primero que tenemos que calcular es la autocorrelación de la señal de un sólo sarcómero. Aunque la señal de un sarcómero sea una señal determinista y de energía finita, en un caso real esta señal está contaminada por ruido gaussiano, que es un proceso aleatorio. Esto hace que la señal total se convierta también en un proceso aleatorio. Así pues, la autocorrelación de un proceso aleatorio debe formularse a partir de sus valores esperados. Por

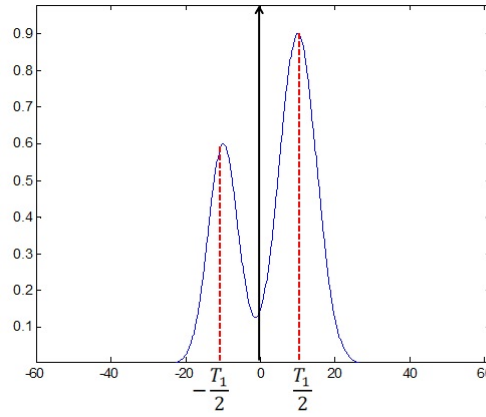


Figura 8.3: Definición de la señal de un sarcómero como suma de gaussianas

lo tanto, calculamos la autocorrelación de un sarcómero como muestra la ecuación 8.4

$$s_T(x) = s(x) + n(x) \quad (8.3)$$

$$R_{s_T s_T}(\tau) = E\{(s(x) + n(x)) \cdot (s(x - \tau) + n(x - \tau))^*\} \quad (8.4)$$

El ruido se considera ruido blanco, gaussiano, de media nula e incorrelado con la señal. Por lo tanto si desarrollamos la expresión 8.4 tenemos que la autocorrelación total es la suma de la autocorrelación del sarcómero más la autocorrelación del ruido (ver ecuación 8.5).

$$R_{s_T s_T}(\tau) = R_{ss}(\tau) + R_{nn}(\tau) \quad (8.5)$$

En el caso de ruido blanco gaussiano, su autocorrelación puede expresarse como  $R_{nn}(\tau) = \sigma_n^2 \delta(\tau)$

La autocorrelación del sarcómero,  $R_{ss}(\tau)$ , al tratarse de una señal determinista de energía finita, se calcula como la convolución entra la señal y ella misma girada y conjugada, es decir  $R_{ss}(\tau) = s(\tau) \circ s(-\tau)^*$ . Como se trata de una señal real el conjugado no afecta. Partiendo de la definición del sarcómero mostrada en la ecuación 8.1 y desarrollando obtenemos:

$$\begin{aligned}
R_{ss}(\tau) &= \int_{-\infty}^{\infty} s(x)s(x-\tau)dx \\
&= \int_{-\infty}^{\infty} [\alpha_-g_-(x - \frac{T_1}{2}) + \alpha_+g_+(x + \frac{T_1}{2})][\alpha_-g_-(x - \tau - \frac{T_1}{2}) + \alpha_+g_+(x - \tau + \frac{T_1}{2})]dx \\
&= \int_{-\infty}^{\infty} \alpha_-^2g_-(x - \frac{T_1}{2})g_-(x - \tau - \frac{T_1}{2})dx + \int_{-\infty}^{\infty} \alpha_- \alpha_+g_-(x - \frac{T_1}{2})g_+(x - \tau + \frac{T_1}{2})dx \\
&+ \int_{-\infty}^{\infty} \alpha_+ \alpha_-g_+(x + \frac{T_1}{2})g_-(x - \tau - \frac{T_1}{2})dx + \int_{-\infty}^{\infty} \alpha_+^2g_+(x + \frac{T_1}{2})g_+(x - \tau + \frac{T_1}{2})dx
\end{aligned} \tag{8.6}$$

Las funciones  $g_i(x)$  se definen como una gaussiana de media nula y varianza  $\sigma_i^2$ . La convolución de dos gaussianas da como resultado otra gaussina cuya media se corresponde a la suma de medias y varianza a la suma de varianzas tal y como muestra la expresión 8.8.

$$g_i = e^{\frac{-(t-\mu_i)^2}{2\sigma_i^2}}, g_j = e^{\frac{-(t-\mu_j)^2}{2\sigma_j^2}} \tag{8.7}$$

$$g_i \circ g_j = e^{\frac{-(t-(\mu_i+\mu_j))^2}{2(\sigma_i^2+\sigma_j^2)}} \tag{8.8}$$

Finalmente, si denominamos  $R_{g_i g_j}(\tau) = g_i(\tau) \circ g_j(-\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} g_i(x)g_j(x-\tau)dx$ , la autocorrelación de un sarcómero queda expresada como:

$$\begin{aligned}
R_{ss}(\tau) &= \alpha_-^2 R_{g_-g_-}(\tau) + \alpha_+^2 R_{g_+g_+}(\tau) \\
&+ \alpha_- \alpha_+ R_{g_-g_+}(\tau) \circ \delta(\tau - T_1) + \alpha_+ \alpha_- R_{g_+g_-}(\tau) \circ \delta(\tau + T_1) \\
&= \alpha_-^2 R_{g_-g_-}(\tau) + \alpha_+^2 R_{g_+g_+}(\tau) \\
&+ \alpha_- \alpha_+ R_{g_-g_+}(\tau) \circ [\delta(\tau - T_1) + \delta(\tau + T_1)]
\end{aligned} \tag{8.9}$$

En la figura 8.4 se puede ver un ejemplo de como sería la autocorrelación para  $T_1 = 20 \text{ px}$ ,  $\alpha_- = 0,95$ ,  $\sigma_- = 6,25$ ,  $\alpha_+ = 0,63$  y  $\sigma_+ = 2,25$ .

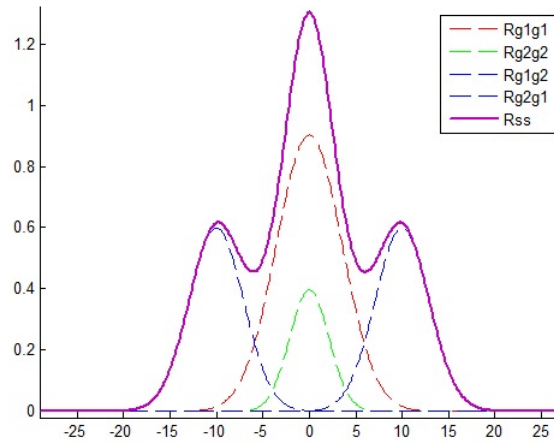


Figura 8.4: Autocorrelación de un sarcómero definido lo más general posible

### 8.2.2. Autocorrelación de una miofibrilla compuesta por $M$ sarcómeros

Una vez calculada la autocorrelación de un sarcómero, el siguiente paso es calcular la autocorrelación de toda una miofibrilla que está compuesta por  $m$  sarcómeros diferentes separados una distancia  $T_2$ . Además hay que tener en cuenta que nuestra señal está contaminada por ruido, que supondremos gaussiano, blanco, de media nula e incorrelado con la señal.

Así pues, podemos expresar la señal de una miofibrilla como se muestra en la expresión 8.10

$$f(x) = \sum_{m=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} s^m(x - mT_2) + n(x) \quad (8.10)$$

donde  $n(x)$  es ruido gaussiano blanco de media nula, y  $m$  es un superíndice que indica el número de sarcómero.

Por temas de simetría se considerará  $M$  un número impar.

#### 8.2.2.1. Correlación cruzada entre dos sárcomeros

Primero vamos a calcular la correlación entre dos sarcómeros diferentes, separados entre sí una distancia de  $(m - n)T_2$ . Ésta se calcula como:



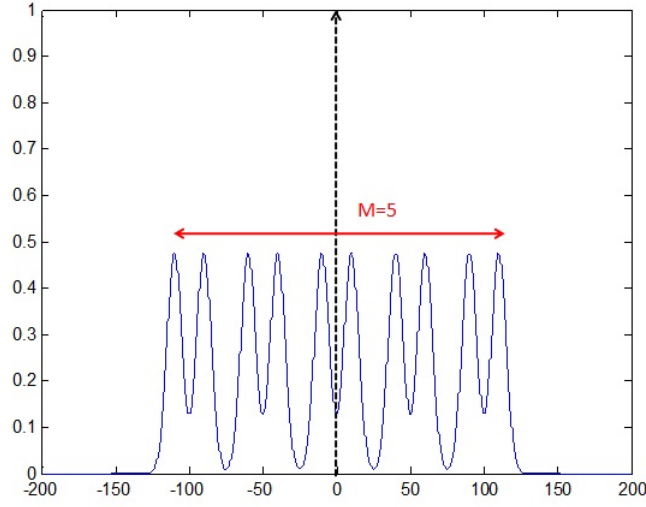


Figura 8.5: Miofibril formada por 5 sarcómeros

$$\begin{aligned}
 R s^n s^m(\tau) &= \int_{-\infty}^{\infty} s^n(x - nT_2) s^m(x - \tau - mT_2) dx \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} [\alpha_-^n g_-^n(x - \frac{T_1}{2} - nT_2) + \alpha_+^n g_+^n(x + \frac{T_1}{2} - nT_2)] \\
 &\quad \cdot [\alpha_-^m g_-^m(x - \tau + \frac{T_1}{2} - mT_2) + \alpha_+^m g_+^m(x - \tau - \frac{T_1}{2} - mT_2)] dx \\
 \dots &= \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \alpha_i^n \alpha_j^m R_{g_i^n g_j^m}(\tau - (m - n)T_2 + (i - j)T_1)
 \end{aligned} \tag{8.11}$$

donde  $\alpha_1 = \alpha_-$ ,  $\alpha_2 = \alpha_+$ ,  $g_1 = g_-$  y  $g_2 = g_+$

#### 8.2.2.2. Autocorrelación de M sarcómeros

Una vez conocemos la expresión de la correlación entre dos sarcómeros nos resultará más fácil calcular la autocorrelación de la miofibril de  $m$  sarcómeros. La autocorrelación se calcula como:

$$\begin{aligned}
R_{ff}(\tau) &= \int_{-\infty}^{\infty} \left[ \sum_{n=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} s^n(x - nT_2) + n(x) \right] \cdot \\
&\quad \cdot \left[ \sum_{m=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} s^m(x - \tau - mT_2) + n(x - \tau) \right]^* dx \\
&= \sum_{n=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \sum_{m=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \left[ \int_{-\infty}^{\infty} s^n(x - nT_2) s^m(x - \tau + mT_2) dx \right] + \int_{-\infty}^{\infty} n(x) n^*(x - \tau) dx \\
&= \dots \sum_{n=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \sum_{m=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \left( \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \alpha_i^n \alpha_j^m Rg_{n_i m_j}(\tau - (m - n)T_2 + (i - j)T_1) \right) + \sigma_n^2 \delta(\tau)
\end{aligned} \tag{8.12}$$

### 8.3. Modelo condicionado: sarcómeros con amplitudes diferentes pero mismas anchuras

La primera aproximación que se puede considerar para poder simplificar el modelo es suponer que las dos gaussianas son iguales (tienen la misma  $\sigma$ ), pero siguen teniendo una amplitud diferente. Esto significaría que estamos considerando que las dos zonas que componen la banda A del sarcómero son igual de anchas. Esta aproximación tiene mucho sentido ya que el sarcómero es una estructura simétrica considerando como eje de simetría la línea M, que es donde situamos nuestro origen de coordenadas al definir el sarcómero.

Tomando esta consideración, se puede escribir la expresión de la señal de un sarcómero como muestra la ecuación 8.13

$$\begin{aligned}
s(x) &= \alpha_- e^{-\frac{(x - \frac{T_1}{2})^2}{2\sigma^2}} + \alpha_+ e^{-\frac{(x + \frac{T_1}{2})^2}{2\sigma^2}} \\
&= \alpha_- g(x - \frac{T_1}{2}) + \alpha_+ g(x + \frac{T_1}{2}) \\
&= g(x) \circ \left[ \alpha_- \delta(x - \frac{T_1}{2}) + \alpha_+ \delta(x + \frac{T_1}{2}) \right]
\end{aligned} \tag{8.13}$$

### 8.3.1. Autocorrelación de un sarcómero

De la misma forma que en el caso anterior calculamos la autocorrelación de un sarcómero como  $R_{sTsT}(\tau) = R_{ss}(\tau) + R_{nn}(\tau)$ , donde  $R_{nn}(\tau) = \sigma_n^2 \delta(\tau)$  y  $R_{ss}(\tau)$  se calcula como:

$$\begin{aligned}
 R_{ss}(\tau) &= \int_{-\infty}^{\infty} [\alpha_- g(x - \frac{T_1}{2}) + \alpha_+ g(x + \frac{T_1}{2})] [\alpha_- g(x - \tau + \frac{T_1}{2}) + \alpha_+ g(x - \tau + \frac{T_1}{2})] dx \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} \alpha_-^2 g(x - \frac{T_1}{2}) g(x - \tau - \frac{T_1}{2}) dx + \int_{-\infty}^{\infty} \alpha_- \alpha_+ g(x - \frac{T_1}{2}) g(x - \tau + \frac{T_1}{2}) dx \\
 &+ \int_{-\infty}^{\infty} \alpha_+ \alpha_- g(x + \frac{T_1}{2}) g(x - \tau - \frac{T_1}{2}) dx + \int_{-\infty}^{\infty} \alpha_+^2 g(x + \frac{T_1}{2}) g(x - \tau + \frac{T_1}{2}) dx \\
 &= R_{gg}(\tau) \circ [(\alpha_-^2 + \alpha_+^2) \delta(\tau) + \alpha_- \alpha_+ (\delta(\tau - T_1) + \delta(\tau + T_1))] \quad (8.14)
 \end{aligned}$$

$R_{gg}(\tau)$  es la autocorrelación de la gaussiana y tiene como expresión:  $R_{gg}(\tau) = e^{-\frac{\tau^2}{4\sigma^2}}$ .

Siguiendo con el ejemplo del caso anterior, en la figura 8.6 se puede ver como es ahora la autocorrelación para un sarcómero que tiene las siguientes características:  $T_1 = 20 \text{ px}$ ,  $\alpha_1 = 0,95$ ,  $\alpha_2 = 0,63$  y  $\sigma = 6,25$ .

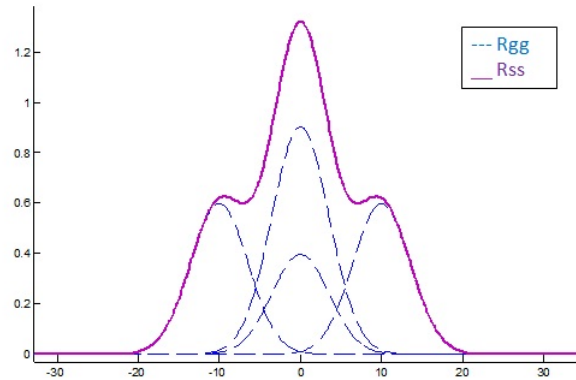


Figura 8.6: Autocorrelación de un sarcómero formado por gaussianas que tienen igual  $\sigma$

### 8.3.2. Autocorrelación de una miofibra compuesta por M sarcómeros

Una vez calculada la nueva expresión de la autocorrelación de un sarcómero, volvemos a calcular la autocorrelación de toda la miofibra. Ésta se expresa igual que en el apartado anterior (ver expresión 8.10).

#### 8.3.2.1. Correlación cruzada entre dos sarcómeros

Igual que hicimos en el modelo genérico, primero calcularemos la correlación entre dos sarcómeros pero ahora teniendo en cuenta la nueva expresión del sarcómero. Así pues, la correlación cruzada se calcula como se detalla a continuación:

$$\begin{aligned}
 Rs^m s^m(x) &= \int_{-\infty}^{\infty} s^n(x - nT_2) s^m(x - \tau + mT_2) dx \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} [\alpha_-^n g^n(x - \frac{T_1}{2} - nT_2) + \alpha_+^n g^n(x + \frac{T_1}{2} - nT_2)] \\
 &\quad \cdot [\alpha_-^m g^m(x - \tau + \frac{T_1}{2} + mT_2) + \alpha_+^m g^m(x - \tau - \frac{T_1}{2} + mT_2)] dx \\
 &= \dots \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \alpha_i^n \alpha_j^m R_{g^n g^m}(\tau - (m - n)T_2 - (i - j)T_1) \\
 &= R_{g^n g^m}(\tau) \circ \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \alpha_i^n \alpha_j^m \delta(\tau - (m - n)T_2 - (i - j)T_1)
 \end{aligned} \tag{8.15}$$

#### 8.3.2.2. Autocorrelación de M sarcómeros

Una vez obtenida la expresión de la correlación entre dos sarcómeros podemos obtener la nueva expresión de la autocorrelación de la miofibra de  $m$  sarcómeros que, igual que en el caso anterior, sigue la expresión 8.10. De esta manera, la autocorrelación total se calcula como:

$$\begin{aligned}
R_{ff}(\tau) &= \int_{-\infty}^{\infty} \left[ \sum_{n=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} s^n(x - nT_2) + n(x) \right] \left[ \sum_{m=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} s^m(x - \tau - mT_2) + n(x - \tau) \right]^* dx \\
&= \int_{-\infty}^{\infty} \left[ \sum_{n=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \sum_{m=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} s^n(x - nT_2) s^m(\Delta + mT_2 - x) \right] dx + \int_{-\infty}^{\infty} n(x) n^*(x - \tau) dx \\
&= \dots \sum_{n=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \sum_{m=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \left( \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \alpha_i^n \alpha_j^m R_{g^n g^m}(\tau - (m - n)T_2 - (i - j)T_1) \right) + \sigma_n^2 \delta(\tau) \\
&= \sum_{n=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \sum_{m=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} R_{g^n g^m}(\tau) \circ \left[ \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \alpha_i^n \alpha_j^m \delta(\tau - (m - n)T_2 + (i - j)T_1) \right] \\
&+ \sigma_n^2 \delta(\tau) \tag{8.16}
\end{aligned}$$

Si reorganizamos la ecuación 8.16 como muestra la expresión 8.17 se observan dos términos separados. El primer término (1) corresponde a la interacción entre sarcómeros y el segundo (2) se corresponde al efecto de la iluminación de cada sarcómero. Por lo tanto podemos separar dos efectos distintos que tenemos en nuestra señal: la interacción y la iluminación.

Esto nos servirá en un futuro para poder estudiar los artefactos de iluminación de las miofibras.

$$R_{ff}(\tau) = \sum_{n=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \sum_{m=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \left[ R_{g^n g^m}(\tau) \circ \underbrace{\sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \alpha_i^n \alpha_j^m \delta(\tau - (i - j)T_1)}_1 \circ \underbrace{\delta(\tau - (m - n)T_2)}_2 \right] \tag{8.17}$$

## 8.4. Modelo simétrico: sarcómeros con amplitudes y anchuras iguales

La siguiente y última aproximación que realizaremos es suponer que las gaussianas no solamente son de igual anchura sino que además tienen

la misma amplitud, es decir, el sarcómero se define como una señal completamente simétrica respecto la línea M. Tomando esta aproximación, se puede expresar la señal del sarcómero como muestra la expresión 8.18.

$$s(x) = \alpha \left( e^{-\frac{(x-\frac{T_1}{2})^2}{2\sigma^2}} + e^{-\frac{(x+\frac{T_1}{2})^2}{2\sigma^2}} \right) = \alpha g(x) \circ \left( \delta(x - \frac{T_1}{2}) + \delta(x + \frac{T_1}{2}) \right) \quad (8.18)$$

#### 8.4.1. Autocorrelación de un sarcómero

De la misma forma que en los casos anteriores calculamos la autocorrelación de un sarcómero como  $R_{sTsT}(\tau) = R_{ss}(\tau) + R_{nn}(\tau)$ , donde  $R_{nn}(\tau) = \sigma_n^2 \delta(\tau)$  y  $R_{ss}(\tau)$  tiene como expresión:

$$\begin{aligned} R_{ss}(\tau) &= \int_{-\infty}^{\infty} [\alpha g(x - \frac{T_1}{2}) + \alpha g(x + \frac{T_1}{2})] [\alpha g(x - \tau - \frac{T_1}{2}) + \alpha g(x - \tau + \frac{T_1}{2})] dx \\ &= 2\alpha^2 R_{gg}(\Delta\tau) + \alpha^2 R_{gg}(\tau - T_1) + \alpha^2 R_{gg}(\tau + T_1) \\ &= R_{gg}(\tau) \circ [2\alpha^2 \delta(\tau) + \alpha^2 (\delta(\tau - T_1) + \delta(\tau + T_1))] \end{aligned} \quad (8.19)$$

En este caso vemos que siempre se cumple que la relación entre el lóbulo principal y el lóbulo secundario de la autocorrelación es de  $\frac{1}{2}$ . Este hecho se puede comprobar en la figura 8.7, donde se ha definido el sarcómero con las siguientes características:  $T_1 = 20 px$ ,  $\alpha = 0,95$  y  $\sigma = 6,25$ .

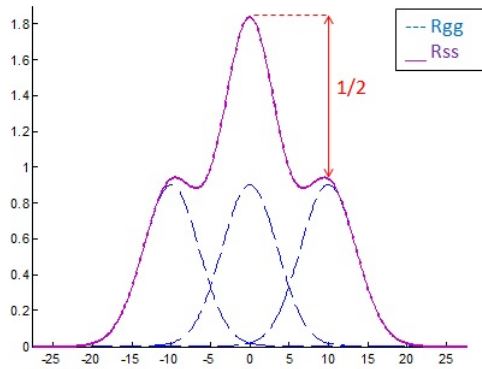


Figura 8.7: Autocorrelación de un sarcómero simétrico (igual  $\alpha$  y igual  $\sigma$  para ambas gaussianas)

## 8.4.2. Autocorrelación de una miofibra compuesta por M sarcómeros

Una vez calculada la autocorrelación de un sarcómero, calcularemos la autocorrelación de toda la miofibra, que se expresa igual que en los apartados anteriores (ver expresión 8.10).

### 8.4.2.1. Correlación cruzada entre dos sarcómeros

Al igual que hicimos en los casos anteriores primero calculamos la correlación entre dos sarcómeros simétricos. Siguiendo la misma formulación que en los apartados anteriores se obtiene:

$$\begin{aligned}
 Rs^n s^m(x) &= \int_{-\infty}^{\infty} s^n(x - nT_2) s^m(x - \tau - mT_2) dx \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} [\alpha^n g^n(x - \frac{T_1}{2} - nT_2) + \alpha^n g^n(x + \frac{T_1}{2} - nT_2)] \\
 &\quad \cdot [\alpha^m g^m(x - \tau - \frac{T_1}{2} - mT_2) + \alpha^m g^m(x - \tau + \frac{T_1}{2} - mT_2)] dx \\
 &= \dots \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \alpha^n \alpha^m R_{g^n g^m}(\tau - (m - n)T_2 - (i - j)T_1) \\
 &= \alpha^n \alpha^m R_{g^n g^m}(\tau) \circ \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \delta(\Delta - (m - n)T_2 - (i - j)T_1)
 \end{aligned} \tag{8.20}$$

### 8.4.2.2. Autocorrelación de M sarcómeros

Una vez obtenida la expresión de la correlación entre dos sarcómeros podemos obtener la expresión general de la autocorrelación de la miofibra de  $m$  sarcómeros que, igual que en los casos anteriores, sigue la expresión 8.10. De esta manera, la autocorrelación total se calcula como:

$$\begin{aligned}
R_{ff}(\tau) &= \int_{-\infty}^{\infty} \left[ \sum_{n=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} s^n(x - nT_2) + n(x) \right] \left[ \sum_{m=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} s^m(x - \tau - mT_2) + n(x - \tau) \right]^* dx \\
&= \int_{-\infty}^{\infty} \sum_{n=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \sum_{m=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} s^n(x - nT_2) s^m(x - \tau + mT_2) dx + \int_{-\infty}^{\infty} n(x) n^*(x - \tau) dx \\
&= \dots \sum_{n=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \sum_{m=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \left( \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \alpha^n \alpha^m R_{g^n g^m}(\tau - (m - n)T_2 - (i - j)T_1) \right) + \sigma_n^2 \delta(\tau) \\
&= \sum_{n=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \sum_{m=-\frac{M-1}{2}}^{\frac{M-1}{2}} \alpha^n \alpha^m R_{g^n g^m}(\tau) \circ \left[ \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \delta(\tau - (m - n)T_2 - (i - j)T_1) \right] \\
&+ \sigma_n^2 \delta(\tau) \tag{8.21}
\end{aligned}$$

La expresión 8.21 es la manera más simplificada de expresar la autocorrelación de una miofibra.

En los siguientes apartados evaluaremos el comportamiento de los 3 modelos y veremos que nivel de aproximación podemos adoptar en función del error que cometemos al ajustar la señal de las miofibras con los diferentes modelos.

## 8.5. Evaluación de los diferentes modelos

El objetivo principal de hacer aproximaciones en nuestro modelo paramétrico no es otro que reducir el coste computacional del ajuste de los datos al modelo paramétrico, ya que ajustar la señal al modelo es un proceso muy costoso. Por lo tanto queremos evaluar el comportamiento del modelo paramétrico estudiando el tiempo de ejecución y el error cometido según el nivel de aproximación que se adopte.

Los tres modelos a evaluar son: el modelo genérico, el modelo condicionado (igual  $\sigma$ ) y el modelo simétrico (igual  $\sigma$  e igual  $\alpha$ ). Para ello, se han tomado 10 imágenes distintas y se han medido las diferentes características con la herramienta para la medida de las distancias explicada en el capítulo 6.

El ajuste de los datos con los diferentes modelos se ha realizado mediante el *toolbox* de *curve fitting* de MATLAB.



En la tabla 8.1 se puede observar el tiempo de ejecución y el error cometido al ajustar los datos a los diferentes modelos en 10 imágenes diferentes. En la gráfica 8.8 se dibuja la evolución del error cometido y el tiempo computacional según el modelo utilizado.

Modelo genérico		Modelo misma $\sigma$		Modelo simétrico	
Tiempo (s)	Error (rmse)	Tiempo (s)	Error (rmse)	Tiempo (s)	Error (rmse)
19,93	0,022	19,85	0,0025	6,54	0,0069
15,33	0,0055	12,02	0,0061	6,22	0,0124
21,76	0,0071	8,69	0,0047	6,36	0,0082
9,84	0,0027	10,30	0,0031	6,42	0,266
13,34	0,0046	10,69	0,0047	6,37	0,034
15,66	0,0061	8,90	0,006	6,43	0,0171
12,69	0,0034	6,53	0,0068	5,07	0,0045
16,74	0,0055	9,38	0,0036	6,47	0,0102
12,20	0,0027	11,88	0,0056	6,54	0,0144
7,82	0,0036	8,50	0,0037	6,52	0,0055
<b>14,531</b>	<b>0,00632</b>	<b>10,674</b>	<b>0,00468</b>	<b>6,294</b>	<b>0,03792</b>

Cuadro 8.1: Medidas de tiempo de ejecución y error cometido al ajustar los datos según el modelo escogido

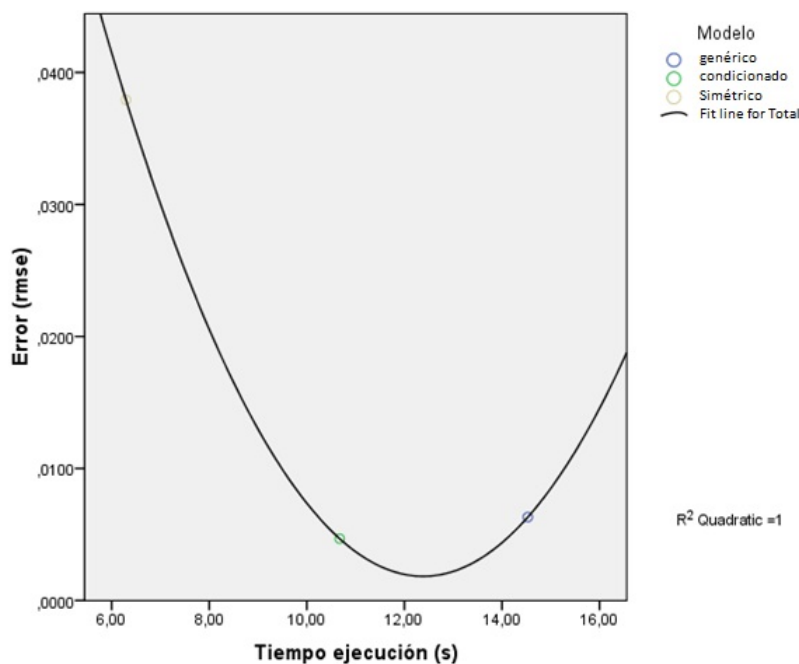


Figura 8.8: Evolución del error y tiempo de ejecución según el modelo utilizado

Se puede observar que el modelo que tiene un mejor comportamiento es el que supone que las anchuras ( $\sigma$ ) de las dos gaussianas, que se corresponde con la anchura de las dos partes de la banda A, son iguales.

Este resultado es totalmente lógico ya que el sarcómero es una estructura

simétrica respecto la línea M, y por lo tanto las dos partes que componen la banda A son iguales. La amplitud de las gaussianas que se corresponde a la señal de SHG que se recibe, no tiene porqué ser igual, ya que si la miofibra no está perfectamente horizontal, que es lo que ocurre en la mayoría de los casos, no se tiene porqué recibir la misma intensidad de señal de una zona de la banda A que de la otra. Una ejemplificación de esta diferencia de iluminación dentro de un mismo sarcómero se puede ver en la figura 8.9.

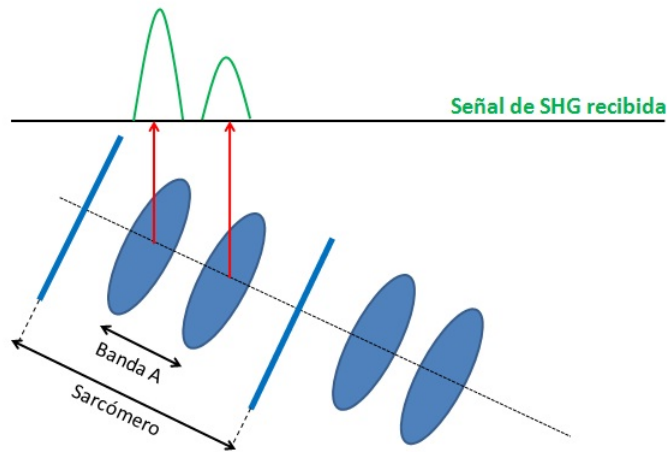


Figura 8.9: Diferencia de señal de SHG de un sarcómero

## 8.6. Validación del modelo matemático

Una vez visto qué nivel de aproximación podemos aplicar al modelo paramétrico procedemos a validarlo. Después de la evaluación del comportamiento de los distintos modelos paramétricos, se va a utilizar el modelo condicionado (igual anchuras ( $\sigma$ ), diferentes amplitudes ( $\alpha_i$ )) ya que es el que presenta una mejor relación error/tiempo de ejecución.

Primero se efectúa la comparación de la señal de autocorrelación obtenida en una imagen y la obtenida tras el ajuste del modelo paramétrico. La señal tras el ajuste del modelo paramétrico en una imagen de sarcómeros ejemplo, comparada con la señal de autocorrelación original, se muestra en la figura 8.10.

En la tabla 8.2 se observan los valores de las amplitudes y de las anchuras de los sarcómeros obtenidas tras el ajuste con el modelo paramétrico, donde se puede apreciar como varían las amplitudes dentro de un mismo sarcómero debido a las diferencias de iluminación que comentábamos.

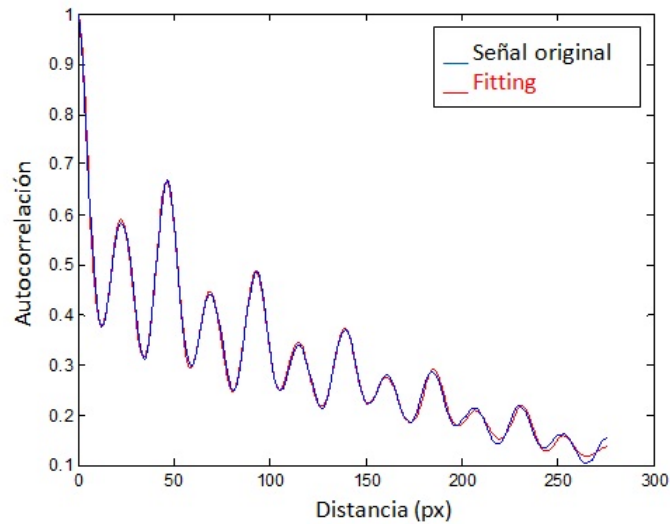


Figura 8.10: Ajuste mediante modelo con igual anchura ( $\sigma$ ) y distintas amplitudes ( $\alpha_i$ )

# sarcómero	amplitudes	anchura
1	0,2803	7,431
	0,1855	
2	0,0629	6,753
	0,1413	
3	0,0503	4,794
	0,2456	
4	0,0985	4,827
	0,3057	
5	0,2053	3,691
	0,3310	
6	0,3148	3,667
	0,4620	
7	0,1505	10
	0,2019	

Cuadro 8.2: Valores de las amplitudes y anchuras obtenidos en el ajuste del modelo paramétrico

Si realizamos el ajuste del modelo paramétrico en 10 imágenes diferentes y comparamos las distancias obtenidas con las calculadas con la herramienta del capítulo 6 y las medidas manualmente se observa como se reduce bastante el error que cometíamos al medir la distancia intrasarcomérica ( $T_1$ ), de un

10,85 % a un 4,74 %. Estos calculos se observan en la tabla 8.3.

#Imagen	Medida manual (px)		Medida mediante herramienta 1 (px)				Medida con modelo matemático (px)			
	T1	T2	T1'	T1'-T1	T2'	T2'-T2	T1''	T1''-T1	T2''	T2''-T2
10	10,75	23,20	8,49	2,26	20,10	3,11	10,93	0,18	20,73	2,47
11	9,62	22,13	9,15	0,47	19,83	2,30	9,74	0,11	21,18	0,95
12	10,97	22,09	9,71	1,26	21,91	0,18	10,38	0,59	21,77	0,32
13	10,07	22,44	10,55	0,48	23,07	0,63	10,59	0,52	22,44	0,01
14	9,11	21,93	9,57	0,46	21,22	0,72	9,00	0,11	21,58	0,35
15	9,69	22,76	9,10	0,59	19,09	3,67	9,48	0,20	20,73	2,03
16	10,21	19,22	9,05	1,16	20,14	0,92	10,44	0,23	20,19	0,96
17	8,90	18,73	9,32	0,42	21,83	3,10	9,83	0,93	19,33	0,60
18	8,34	20,86	9,72	1,37	20,53	0,33	9,59	1,25	20,19	0,68
19	10,81	23,67	9,19	1,62	19,97	3,70	10,24	0,57	22,28	1,39
20	8,78	23,49	10,315	1,54	24,52	1,04	8,40	0,37	19,33	4,15
Media sesgo				1,06		1,79		0,46		1,26
Error %				10,85		8,19		4,74		5,78

Cuadro 8.3: Valores de las distancias obtenidas con el modelo paramétrico y comparadas con las calculadas manualmente y las obtenidas mediante la herramienta del cálculo de distancias, en 10 imágenes distintas.

## 8.7. Limitaciones

Como ya hemos ido comentando durante todo el capítulo la mayor limitación de esta herramienta es el coste computacional, ya que en media, se tarda unos 10,5 segundos en obtener los valores del modelo. Por eso, en un futuro se va a implementar toda la función mediante lenguaje de programación C para así poder optimizar al máximo la función.

## 8.8. Conclusiones

El modelo paramétrico de la autocorrelación del sarcómero diseñado se ajusta muy bien al modelo real. Este modelo nos permite extraer las características morfométricas promedio del sarcómero dentro de una sección de tejido (distancias ( $T_1, T_2$ ) y amplitud de las sub-bandas A ( $\sigma$ )). Gracias a esta caracterización somos capaces de corregir la medida de la distancia intrasarcómerica cuando ésta está contaminada por la interferencia del segundo pico de la distancia intersarcomérica.

# Capítulo 9

## Resultados de la herramienta integral

### 9.1. Introducción

El objetivo principal de este proyecto es diseñar una herramienta integrada que cuantifique características morfométricas de los cardiomiocitos con alta fiabilidad, como son las distancias del sarcómero y la distancia entre las localizaciones de SERCA, para evaluar la existencia o no de remodelado celular. Para el diseño de esta herramienta integral se han desarrollado y validado satisfactoriamente 3 herramientas: medida de distancias en estructuras fibrilares, seguimiento de fibras y modelo paramétrico del sarcómero. En este capítulo se valida la integración de estas herramientas para obtener finalmente una única herramienta que proporciona el valor de las distancia deseadas.

La integración de las tres herramientas difiere un poco en caso de las imágenes de SERCA ya que, para cuantificar la distancia entre localizaciones de SERCA, no se requiere realizar el modelado paramétrico. Así pues, el diagrama de la herramienta integrada es el que se muestra en la figura 9.1.

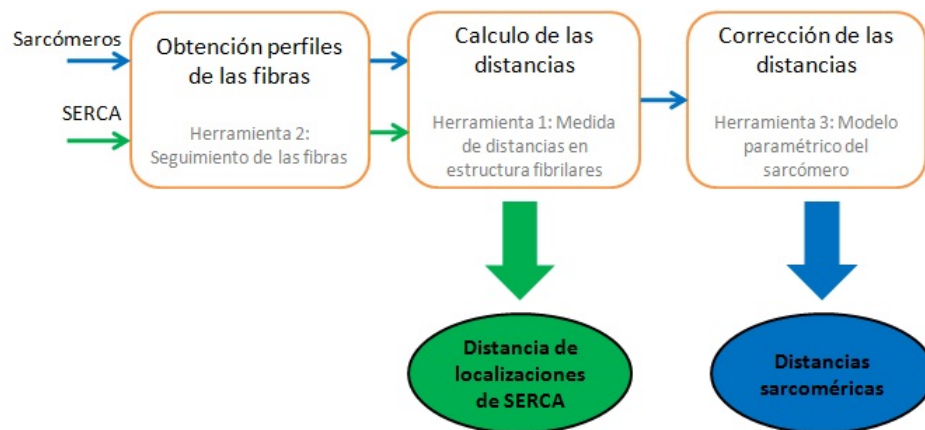


Figura 9.1: Diagrama de la herramienta integrada

## 9.2. Validación

Para comprobar el buen funcionamiento de la herramienta se van a cuantificar diferentes imágenes de un individuo y se va a comparar el valor medio y la varianza de las medidas obtenidas, con las medidas realizadas con la primera herramienta, es decir, seleccionando manualmente una zona de la imagen.

### 9.2.1. Distancia entre localizaciones de SERCA

Para el caso de las imágenes de SERCA se han medido 5 imágenes diferentes del mismo individuo mediante la herramienta 1 (ver apartado 6.6) y mediante la herramienta integral. Los resultados de las medidas son los que se observan en la tabla 9.1.

Tal y como se puede observar en la tabla 9.1 la medida de la distancia entre localizaciones de SERCA se realiza correctamente, ya que la distancia media obtenida con la herramienta integral se acerca más a la distancia media medida manualmente. Además la varianza que se obtiene con la herramienta integral es un 16 % más pequeña que la obtenida con la herramienta 1, y un 74,28 % más pequeña que la que se obtiene midiendo manualmente.

#image	Distancia SERCA (píxeles)		
	Medida manual	Medida anterior	Medida Nueva
1	19,14	19,51	19,05
2	20,05	19,07	20,18
3	20,75	19,19	19,98
4	21,59	19,70	19,93
5	19,29	20,51	19,15
<b>MEDIA</b>	20,17	19,59	19,66
<b>VARIANZA</b>	1,05	0,32	0,27

Tabla 9.1: Comparación entre medidas manuales, mediante delineación manual y mediante la herramienta integral en imágenes de SERCA

### 9.2.2. Distancias del sarcómero

Los resultados obtenidos tras analizar 10 imágenes de un mismo individuo son los que se muestran en la tabla 9.2. En esta tabla, H1: herramienta 1 (medida de distancia), H2: herramienta 2 (seguimiento de fibras) y H3: herramienta 3: modelo paramétrico.

#imagen	DISTANCIA 1 INTRASARCOMERICA (píxeles)				DISTANCIA 2 INTERSARCOMERICA (píxeles)			
	Manual	Medida H1	Medida H1+H2	Medida H1+H2+H3	Manual	Medida H1	Medida H1+H2	Medida H1+H2+H3
10	10,75	8,49	10,38	10,43	23,20	20,10	23,26	23,56
11	9,62	9,15	10,03	10,14	22,13	19,83	21,97	22,03
12	10,97	9,71	10,3	10,25	22,09	21,91	21,97	22,10
13	10,07	10,55	10,33	9,99	22,44	23,07	21,82	21,55
14	9,11	9,57	9,97	9,90	21,93	21,22	21,69	21,52
15	9,69	9,10	10,01	9,97	22,76	19,09	22,01	22,01
16	10,21	9,05	9,84	9,62	19,22	20,14	21,94	21,27
17	8,90	9,32	10,14	10,13	18,73	21,83	22,15	21,72
18	8,34	9,72	10,27	10,37	20,86	20,53	22,72	22,46
19	10,81	9,19	9,89	9,67	23,67	19,97	22,26	21,69
20	8,78	10,315	9,83	9,71	23,49	24,52	21,97	21,64
<b>MEDIA</b>	9,75	9,47	10,09	10,02	21,87	21,11	22,16	21,96
<b>VARIANZA</b>	0,80	0,35	0,04	0,08	2,67	2,60	0,20	0,39

Tabla 9.2: Comparación entre medidas manuales y medidas mediante herramienta 1, con herramienta 1 y 2 y con la herramienta integral (herramientas 1, 2 y 3)

En los resultados obtenidos se observa como los valores medios de las distancias calculados mediante la herramienta integral coinciden con los calculados manualmente. Además la varianza ha decrecido enormemente, un 90 % en el cálculo de la distancia intrasarcomérica respecto a las medidas relizadas manualmente y un 77,14 % respecto a las medidas realizadas con la herramienta 1. En el caso de la distanca intersarcomérica la varianza ha decrecido un 85,39 % respecto a las medidas realizadas manualmente y un

85 % respecto a las medidas realizadas con la herramienta 1.

### **9.3. Conclusiones**

Los resultados obtenidos son muy favorables ya que indican que somos capaces de medir correctamente tanto la distancia entre localizaciones de SERCA como las distancias del sarcómero, de manera automática y con una variabilidad muy inferior a la que obtendríamos mediante la medida manual. En el capítulo siguiente se va a estudiar la viabilidad de las distancias como biomarcador cuantitativo de imagen del remodelado cardíaco celular.



## Capítulo 10

# Resultados de relevancia clínica en animales y humanos

UNA vez evaluada la aceptación de la herramienta integrada para el cálculo de las distancias, se pasa a calcular las distancias entre localizaciones de SERCA y las distancias sarcoméricas en diferentes controles y casos (CIR), tanto en muestras del modelo animal de restricción de crecimiento como en muestras humanas. Posteriormente se realiza la estadística para comparar los dos grupos y así evaluar la existencia de un remodelado cardíaco celular y la potenciabilidad de estas cuantificaciones morfométricas como biomarcadores cuantitativos de imagen del remodelado cardíaco.

La estadística para comprobar si las poblaciones son significativamente distintas se ha realizado mediante el método clásico no paramétrico Wilcoxon.

### 10.1. Resultados en el modelo animal

#### 10.1.1. Distancia de localizaciones de SERCA

El grupo de estudio utilizado para medir la distancia entre localizaciones de SERCA está compuesto por 9 controles y 9 casos (CIR). De cada individuo se han tomado 10 imágenes en dos zonas diferentes de tejido. Se realiza la media de las 10 distancias medidas de cada zona. Finalmente se realiza una

media ponderada por el área medida de cada zona y se obtiene la distancia de cada individuo de la población.

Los resultados obtenidos son lo que se observan en la figura 10.1.

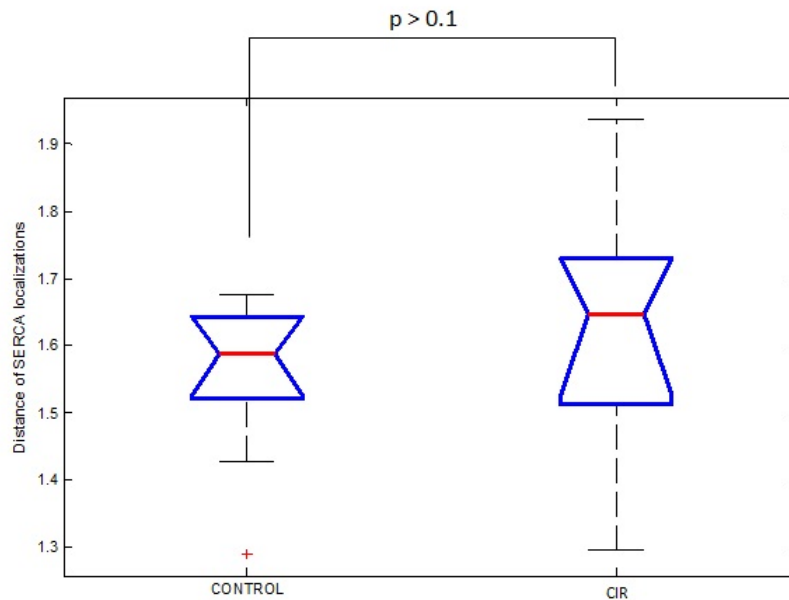


Figura 10.1: Distancia de localizaciones de SERCA en controles y casos

Se observa una ligera diferencia en la distancia de localizaciones de SERCA, siendo ésta de  $1,5\mu m$  en los controles y  $1,6\mu m$  en los casos, pero no es significativa ya que la  $p$  obtenida es mayor a 0.05. No obstante, los casos CIR poseen una variabilidad mayor y ello quizás refleje algún otro tipo de alteración.

### 10.1.2. Distancias del sarcómero

El grupo de estudio utilizado para medir las distancias sarcoméricas está compuesto por 6 controles y 7 casos (CIR). De cada individuo se han tomado 10 imágenes. Se obtienen las distancias inter y intrasarcoméricas de cada imagen y se promedian para obtener un valor de cada individuo.

#### 10.1.2.1. Distancia intrasarcomérica

Los resultados de la medida de la distancia intrasarcomérica de las dos poblaciones se muestran en la figura 10.2.

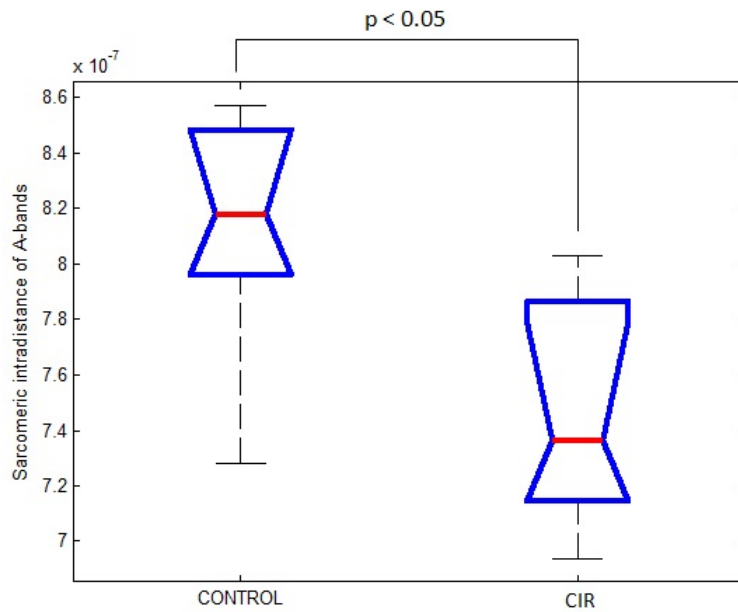


Figura 10.2: Comparación de la distancia intrasarcomérica entre controles y casos en modelo animal

El valor medio de la distancia intrasarcomérica es de  $0,74 \mu m$  para los casos y de  $0,81 \mu m$  para los controles. La significancia es menor del 0.05 lo que indica que la diferencia entre las dos poblaciones es significativa.

#### 10.1.2.2. Distancia intersarcomérica

Los resultados de la medida de la distancia intersarcomérica de las dos poblaciones se muestran en la figura 10.3.

El valor medio de la distancia intrasarcomérica es de  $1,63 \mu m$  para los casos y de  $1,80 \mu m$  para los controles. La significancia es menor del 0.05 lo que indica que la diferencia entre las dos poblaciones es significativa.

## 10.2. Resultados de muestras humanas

El grupo de estudio utilizado para medir las distancias sarcoméricas en muestras humanas está compuesto por 5 controles y 4 casos (CIR). De cada individuo se han tomado 10 imágenes. Se obtienen las distancias inter e

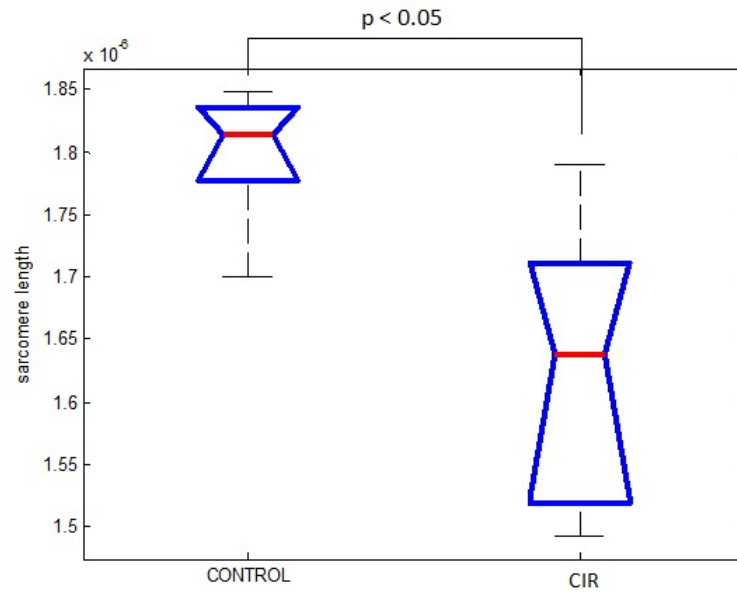


Figura 10.3: Comparación de la distancia intersarcomérica entre controles y casos en modelo animal

intrasarcoméricas de cada imagen y se promedian para obtener un valor de cada individuo.

## 10.2.1. Distancias del sarcómero

### 10.2.1.1. Distancia intrasarcomérica

Los resultados de la medida de la distancia intrasarcomérica de las dos poblaciones se muestran en la figura 10.4

El valor medio de la distancia intrasarcomérica es de  $0,65 \mu m$  para los casos y de  $0,75 \mu m$  para los controles. La significancia es menor del 0.05 lo que indica que la diferencia entre las dos poblaciones es significativa.

### 10.2.1.2. Distancia intersarcomérica

Los resultados de la medida de la distancia intersarcomérica de las dos poblaciones se muestran en la figura 10.5

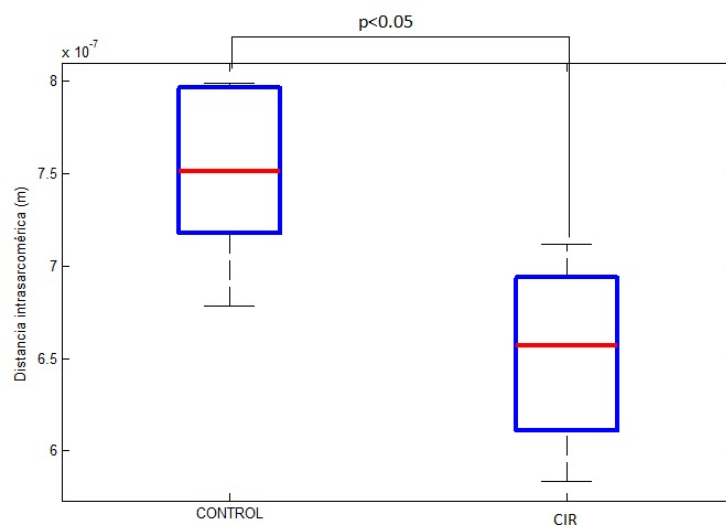


Figura 10.4: Comparación de la distancia intrasarcomérica entre controles y casos en muestras humanas

El valor medio de la distancia intersarcomérica es de  $1,39 \mu m$  para los casos y de  $1,65 \mu m$  para los controles. La significancia es menor del 0.05 lo que indica que la diferencia entre las dos poblaciones también es significativa.

Estos resultados confirman la hipótesis clínica de que el remodelado cardíaco viene precedido de un remodelado a nivel celular. Esto evidencia la existencia de una alteración de la ultraestructura cardíaca en los fetos que presentan restricción de crecimiento intrauterina, ya que poseen unas distancias inter e intrasarcoméricas más cortas que los controles. Este hallazgo es de una gran importancia ya que sugiere que el mecanismo de contracción en los CIR está dañado. Junto con otros, estos resultados van a ser publicados en *Circulation*, una de las revistas de cardiología con mayor factor de impacto (FI=14.8).

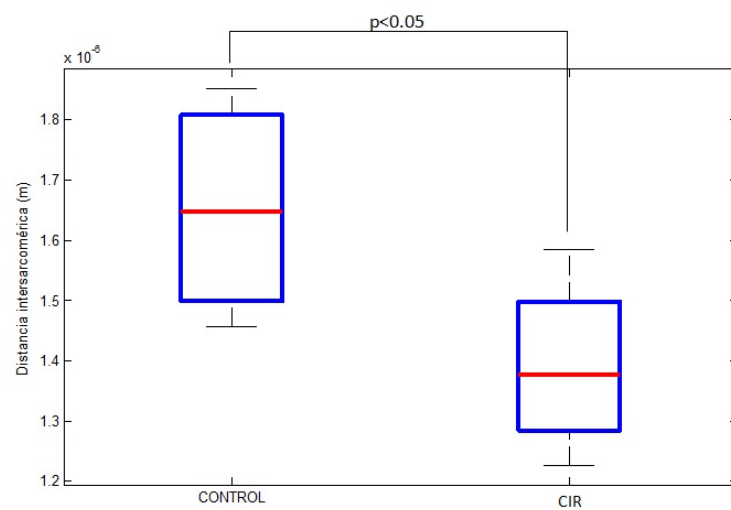


Figura 10.5: Comparación de la distancia intersarcomérica entre controles y casos en muestras humanas

# Capítulo 11

## Conclusiones y futuro

El objetivo principal de este proyecto era el desarrollo de una herramienta capaz de cuantificar características morfométricas de imágenes obtenidas mediante microscopía multifotónica, para evaluar el remodelado cardíaco a nivel celular. Así pues este proyecto es una prueba de concepto que utiliza herramientas de procesamiento de imagen para ver si es posible realizar medidas cuantitativas en imágenes de microscopía, de forma automática, para la caracterización tisular, que sean indicadoras de la existencia de un remodelado celular.

### 11.1. Conclusiones

La evaluación histopatológica de tejidos es una técnica subjetiva que debe ser realizada por expertos que sean capaces de clasificar visualmente, cuando un tejido tiene características normales o ha sufrido algún tipo de alteración o daño. Es una técnica que consume mucho tiempo y además, este tipo de evaluación de tejidos crea discrepancia inter e intra-observador. Esto hace que sea un método para la evaluación de daño en el tejido poco reproducible.

La herramienta diseñada es una prueba de que se pueden cuantificar características morfométricas del tejido cardíaco de manera automática, y sin necesidad de un experto, evitando así la variabilidad derivada de la subjetividad del operador. Gracias a eso nuestra herramienta se convierte en una técnica totalmente reproducible.

Las características morfométricas que se han cuantificado en este proyecto han sido evaluadas, como prueba de concepto, para estudiar el remodelado cardíaco a nivel celular, y los resultados obtenidos han sido satisfactorios. Las características morfométricas estudiadas son indicativas de un retraso en la maduración del feto y por lo tanto apoyan la hipótesis de que el remodelado del corazón en los fetos con restricción de crecimiento viene precedido por un remodelado celular. Estos resultados tienen una alta relevancia clínica y por eso van a ser publicados en una revista clínica de cardiología de elevado factor de impacto como es *Circulation*.

El entorno de programación en el cual se ha desarrollado este proyecto es MATLAB. Se ha optado por MATLAB por su versatilidad y su número elevado de funciones para el procesamiento de imagen, ya implementadas y optimizadas. Además es uno de los lenguajes de programación más usados en la investigación biomédica.

Este proyecto se ha realizado en un grupo de investigación transdisciplinar formado por médicos, biólogos, físicos, ingenieros... Es por eso que para la realización de este proyecto he tenido que aprender muchos conceptos médicos y biológicos que me han ayudado a comunicarme mejor con el grupo de trabajo.

## **11.2. Trabajo futuro**

El primer paso que se va a realizar es integrar esta herramienta con otras herramientas de microscopía cuantitativa para PSHG (*Polarized Second Harmonic Generation*) como por ejemplo la herramienta que mide el *helical pitch* de las fibras del tejido cardíaco [3]. Esto nos permitirá ampliar el conjunto de características cuantitativas del tejido cardíaco para evaluar el remodelado celular.

Esta herramienta, junto con otras nuevas que se van a diseñar, van a ser utilizadas en otros campos de la microscopía como la ultramicroscopía [14]. Se van a realizar nuevas herramientas que permitan obtener y reconstruir imágenes en tres dimensiones del corazón fetal.

Los órganos que más alteraciones sufren en la restricción de crecimiento intrauterina son el corazón y el cerebro. Por eso se va a aumentar el ámbito de



aplicabilidad de las herramientas de procesamiento de imagen para la microscopía cuantitativa y se usarán para estudiar no sólo tejido cardíaco, sino también tejido cerebral.



# Bibliografía

- [1] European Cardiovascular Disease Statistics, 2008.
- [2] Abcam. Cardiac atrophy.
- [3] I. Amat-Roldan, S. Psilodimitrakopoulos, E. Eixarch, I. Torre, B. Wotjas, F. Crispi, F. Figueras, D. Artigas P. Loza-Alvarez, and Gratacos. Myosin helical pitch angle as a quantitative imaging biomarker for characterization of cardiac programming in fetal growth restriction measured by polarization second harmonic microscopy. In Paul J. Campagnola, Ernst H. K. Stelzer, and Gert von Bally, editors, *Advanced Microscopy Techniques*, volume 7367, pages 736700–7, Munich, Germany, July 2009. SPIE.
- [4] H. Bassan, Leonor Leider Trejo, Naam Kariv, Merav Bassan, Esther Berger, Aviva Fattal, Illana Gozes, and Shaul Harel. Experimental intrauterine growth retardation alters renal development. *Pediatric Nephrology*, 15(3-4):192–195, November 2000.
- [5] Benjamin Cummings (Addison Wesley Longman). Anatomy of a muscle.
- [6] Bioimaging ([www.scienceinyoureyes.com](http://www.scienceinyoureyes.com)). Fluorescence microscopy: Science in your eyes.
- [7] Thierry Boulesteix, Emmanuel Beaurepaire, Martin-Pierre Sauviat, and Marie-Claire Schanne-Klein. Second-harmonic microscopy of unstained living cardiac myocytes: measurements of sarcomere length with 20-nm accuracy. *Optics letters*, 29(17):2031–3, September 2004.
- [8] Paul J Campagnola, Heather A Clark, William A Mohler, Aaron Lewis, and Leslie M Loew. Second-harmonic imaging microscopy of living cells. *Microscopy*, 6(3):277–286, 2001.

- [9] Paul J Campagnola and Chen-yuan Dong. Second harmonic generation microscopy : principles and applications to disease diagnosis. *October*, 15:1–15, 2009.
- [10] Fàtima Crispi, Bart Bijmens, Francesc Figueras, Joaquim Bartrons, Elisenda Eixarch, Ferdinand Le Noble, Asif Ahmed, and Eduard Gratacós. Fetal growth restriction results in remodeled and less efficient hearts in children. *Circulation*, 121(22):2427–36, June 2010.
- [11] Fatima Crispi, Edgar Hernandez-Andrade, Maurice M a L Pelsers, Walter Plasencia, Jesus Andres Benavides-Serralde, Elisenda Eixarch, Ferdinand Le Noble, Asif Ahmed, Jan F C Glatz, Kypros H Nicolaides, and Eduard Gratacos. Cardiac dysfunction and cell damage across clinical stages of severity in growth-restricted fetuses. *American journal of obstetrics and gynecology*, 199(3):254.e1–8, September 2008.
- [12] Winfried Denk, James H Strickler, Watt W Webb, New Series, and No Apr. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Microscopy*, 248(4951):73–76, 1990.
- [13] Department Of Anatomy And Cell Biology (Indiana University). Muscle structure.
- [14] Hans-Ulrich Dodt, Ulrich Leischner, Anja Schierloh, Nina Jährling, Christoph Peter Mauch, Katrin Deininger, Jan Michael Deussing, Matthias Eder, Walter Zieglgänsberger, and Klaus Becker. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nature methods*, 4(4):331–6, April 2007.
- [15] E. Gratacós Eixarch, E. F. Figueras , E. Hernández-Andrade , F. Crispi , Nadal B, I. Torre, S. Oliveira. An Experimental Model of Fetal Growth Restriction Based on Selective Ligation of Uteroplacental Vessels in the. *Fetal Diagnosis And Therapy*, 2009.
- [16] Barry H. Greenberg. *Cardiac remodeling: mechanisms and treatment*. Informa Health Care, 2005.
- [17] Jeff W Lichtman and José-angel Conchello. Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2(12), 2005.
- [18] LOCI (www.loci.wisc.edu). Multiple-photon Excitation Fluorescence Microscopy.

- [19] Ferran Marques, Philipe Salembier, and Joan-Ramon Casas. *Digital image and video processing*. 2008.
- [20] MedlinePlus Medical Encyclopedia Image. Types of muscle tissue.
- [21] Molecular Expressions ([www.microscopy.fsu.edu](http://www.microscopy.fsu.edu)). Images from the Microscope.
- [22] Susumu Mori and Peter C M Van Zijl. Fiber tracking : principles and strategies: a technical review. *NMR in Biomedicine*, pages 468–480, 2002.
- [23] OHIO Health ([www.ohiohealth.com](http://www.ohiohealth.com)). Heart muscle structure.
- [24] Optics Laboratory (Ecole Polytechnique Federale De Lausanne). SHRIMP: Second Harmonic Radiation Imaging Probe.
- [25] Ríos and M. *Neuroimagen. Técnicas y procesos cognitivos*. Elsevier España, 2008.
- [26] Sanjaya Kumar Sahoo, Taeyong Kim, Gil Bu Kang, Jung-Gyu Lee, Soo Hyun Eom, and Do Han Kim. Characterization of calumenin-SERCA2 interaction in mouse cardiac sarcoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 284(45):31109–21, November 2009.
- [27] Peter T C So. Two-photon Fluorescence Light Microscopy. *Life Sciences*, pages 1–5, 2002.
- [28] Texas Heart Institute. Anatomia del corazón.
- [29] Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, and Watt W Webb. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature biotechnology*, 21(11):1369–77, November 2003.